



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Estimación de la frecuencia de intercambio de
cromátidas hermanas en linfocitos de sangre periférica
en una población de alpacas (*Vicugna pacos Linnaeus*,
1758) en el distrito de Huachocolpa - Huancavelica**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Josmar Kevin CHAVEZ CHUQUIPUIMA

ASESOR

Jesús Humberto CÓRDOVA SANTA GADEA

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Chavez, J. (2020). *Estimación de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de sangre periférica en una población de alpacas (Vicugna pacos Linnaeus, 1758) en el distrito de Huachocolpa - Huancavelica*. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS (ANEXO 4)

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0002-4422-655X
DNI o pasaporte del autor	DNI: 72917502
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0002-5511-7260
DNI o pasaporte del asesor	DNI: 07726863
Grupo de investigación	GENES, CROMOSOMAS Y GENOMAS DE MAMIFEROS (GECROGEM)
Financiamiento	<p>Un Financiado:</p> <p>1) Nombre y siglas de la agencia financiadora:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Nombre: Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM ✓ Siglas: UNMSM-VRIP <p>País de la agencia financiadora:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Perú <p>Nombre del programa financiero</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Concurso del Programa e Promoción de Tesis de Pregrado Código ✓ B1810048
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>Lugar: Universidad Nacional Mayor de San Marcos</p> <p>País: Perú, Departamento: Lima, Provincia: Lima, Distrito: Lima</p> <p>Coordenadas geográficas: 12°3'30" S, 77°5'0" W (-12.058333, -77.083333)</p>
Año o rango de años que la investigación abarcó	2018-2019
Disciplinas OCDE	Genética, Herencia http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 11:10 horas del 15 de setiembre de 2020, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas con dirección en la G-Suite de Google <https://meet.google.com/nsr-tfyj-zme> y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de JOSMAR KEVIN CHAVEZ CHUQUIPUIMA.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 024-EPGB-2019, el titulado expuso su tesis: **“ESTIMACIÓN DE LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN UNA POBLACIÓN DE ALPACAS (*Vicugna pacos* LINNAEUS, 1758) EN EL DISTRITO DE HUACHOCOLPA – HUANCAMELICA”** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota .18, calificativo: Aprobado con Mención Honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Decanato para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo a JOSMAR KEVIN CHAVEZ CHUQUIPUIMA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 13:10 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 15 de setiembre de 2020.

Mg. OLGA BRACAMONTE GUEVARA
(PRESIDENTA)

Blgo. JESUS CORDOVA SANTA GADEA
(ASESOR)

Blga. MARIA DEL PILAR SUYO TITTO
(MIEMBRO)

Blgo. ALBERTO LÓPEZ SOTOMAYOR
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Jesús Humberto Córdova Santa Gadea por aceptar ser el Asesor de mi Tesis, las valiosas recomendaciones y sugerencias planteadas durante la realización del trabajo y la paciencia demostrada durante todo el proceso de redacción e interpretación de los resultados.

Al criador de alpacas de Huachocolpa que accedió voluntariamente a nuestro requerimiento para estudiar sus rebaño y al Señor Veterinario Juan Carlos Poma García por su asesoría y apoyo durante el muestreo de los animales.

Al VRIPP de la UNMSM por el apoyo financiero brindado al Laboratorio de Genética Humana a través de la aprobación del proyecto “Aplicación de la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas (SCE) en los linfocitos de alpacas (Vicugna pacos) provenientes de Junín y Huancavelica para detectar la presencia de productos ambientales con actividad genotóxica y/o mutagénica” con código B18100481.

A mis profesores:

Margarita VELASQUEZ REINOSO

Ricardo Jaime DESCAILLEAUX DULANTO

Gladys Giovanna MELGAREJO ESTREMADOYRO

Claudia BARLETTA CARRILLO

A mis colegas de laboratorio:

Celes INGA ORTIZ

Lisa María LINARES

Vania IBERICO

Andrea SANCHEZ

Y a mi familia:

Jose CHAVEZ FLORES

Marina CHUQUIPUIMA RICSE

Alexander CHAVEZ CHUQUIPUIMA

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE	5
4.1.1. Camélidos y su taxonomía	5
4.1.2. Alpaca	6
4.1.3. Distribución	6
4.1.4. Centros de Crianza y Manejo de alpacas	8
4.1.5. Importancia biológica y económica	10
4.2. DAÑOS AL ADN	11
4.2.1. Minería en el Perú	11
4.2.2. Contaminación del Ecosistema	12
4.2.3. Evaluación del daño ocasionado	14
4.2.4. Pruebas de evaluación genotóxica	14
4.2.5. Especie centinelas para evaluar condiciones ambientales espacio-temporales.	16
4.3. ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS	16
4.3.1. Historia	16
4.3.2. Formación de los SCE	17
4.3.3. Factores que alteran la frecuencia del SCE	17
4.3.4. Ensayo de SCE	18
4.3.5. Cultivo celular	19
4.3.6. Sustitución de la Timina por Brdu durante la replicación	19
4.3.7. Duración de la respuesta de SCE	20
4.3.8. Test de SCE para evaluar Genotoxicidad Ambiental	20
5. HIPÓTESIS	21
5.1. HIPOTESIS NULA	21
5.2. HIPÓTESIS ALTERNA	21

6. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	21
6.1. OBJETIVO GENERAL	21
6.2. OBJETIVO ESPECIFICO	21
7. MATERIALES Y METODOS	22
7.1. POBLACIÓN.....	22
7.2. TÉCNICA.....	23
7.2.1. Toma de muestra.....	23
7.2.2. Siembra.....	23
7.2.3. Adición del brdu	23
7.2.4. Preparación citológica	24
7.2.5. Adición de la colchicina	24
7.2.6. Hipotonización	24
7.2.7. Pre - fijación	24
7.2.8. Fijación.....	24
7.2.9. Preparación de laminas	24
7.2.10. Tinción diferencial	25
7.3. MEDICIONES.....	25
7.3.1. ÍNDICE DE SCE.....	25
7.3.2. PUNTUACIONES DE SCE EN CADA CROMOSOMA ESTUDIADO	26
7.3.3. UBICACIÓN DE LOS SCE EN EL CROMOSOMA.....	26
7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
8. RESULTADOS	27
8.1. Muestreo realizado	27
8.2. Referente al efecto de BrdU en las metafases observadas	30
8.3. Puntuación de SCE en cada cromosoma observado	37
8.4. Ubicación de los SCE en cada cromosoma observado.....	39
9. DISCUSIÓN.....	42
10. CONCLUSIONES	47
11. RECOMENDACIONES.....	48
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. RESUMEN

La prueba de intercambio de cromátidas hermanas o SCE (del inglés, "Sister Chromatids Exchange") es un ensayo citogenético de resultados a corto plazo. Se utiliza para identificar y evaluar factores físicos o químicos con posibles efectos mutagénicos y/o carcinogénicos en algún organismo (Latt, 1981). Tal prueba se realizó para estimar la frecuencia de SCE en 20 alpacas (*Vicugna pacos*) procedentes del distrito de Huachocolpa (Angaraes, Huancavelica), consideradas sanas y en edad fértil, cuyo establo y zona de pastoreo están ubicadas a menos de 1500 metros de distancia de una zona con actividad minera. Esta prueba se realizó en cultivos de linfocitos de sangre periférica en el laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencia Biológicas de la UNMSM. Los cromosomas mitóticos observados se obtuvieron por cultivo *in vitro* con incorporación de 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) durante dos ciclos de replicación, siendo luego teñidos con Hoescht 33258 y Giemsa (Perry y Wolff, 1974). Los resultados indican que el promedio de SCE/célula en la población de alpacas estudiadas es 8.37 ± 2.39 . La media de SCE obtenida muestra ser superior a otras reportadas en especies cercanamente emparentada (*Camellus dromedarius*), ya que no existe antecedentes en la misma especie ni en otras de camélidos sudamericanos. Los eventos de SCE se clasificaron de 0 a 4 niveles y la prueba de Chi cuadrado ($X^2=0.51$, $P= 0.91$) indicó que los intercambios se disponen según la distribución de Poisson tanto en el total de individuos como separados por sexo. También se analizó la ubicación de los SCE en el cromosoma, encontrándose una proporción de 49.7% de SCE intersticiales, 32.8% de SCE terminales y 17.5% SCE proximales, por otro lado, el brazo q presenta la mayor parte de los SCE (93.9%) en comparación del brazo p (6.1%).

Palabras clave: Alpaca, Genotoxicidad, Minería, Citogenética, SCE.

2. ABSTRACT

The sister chromatid exchange test (SCE) is a cytogenetic test o-term results. It's used to identify and evaluate physical or chemical factors with possible mutagenic and/or carcinogenic effects in an organism. This test was performed to estimate the frequency of SCE in 20 alpacas (*Vicugna pacos*) from the district of Huachocolpa (Angaraes, Huancavelica), considered healthy and of childbearing age, whose stay and grazing area were located less than 1500 meters away from an area with mining activity. This test was performed in cultures of peripheral blood lymphocytes at the Human Genetics laboratory of the Faculty of Biological Sciences at the UNMSM. The mitotic chromosomes observed were obtained by in vitro culture with incorporation of 5-Bromodeoxyuridine (BrdU) during two replication cycles, then being stained with Hoescht 33258 and Giemsa (Perry and Wolff, 1974). The results indicate that the average SCE / cell in the population of alpacas studied is 8.37 ± 2.39 . The average SCE obtained shows to be higher than others reported in closely related species (*Camellus dromedarius*), since there is no history in the same species or in other South American camelids. SCE events were classified from 0 to 4 levels and the Chi-square test ($X^2 = 0.51$, $P = 0.91$) indicated that the exchanges are arranged according to the Poisson distribution both in the total of individuals and separated by sex. The location of the SCEs on the chromosome was also analyzed, finding a proportion of 49.7% of interstitial SCEs, 32.8% of terminal SCEs and 17.5% proximal SCEs, on the other hand, the q arm presents most of the SCEs (93.9%) compared to the p arm (6.1%).

Key words: Alpaca, Genotoxicity, Mining, Cytogenetics, SCE.

3. INTRODUCCIÓN

La alpaca pertenece al grupo de los Camélidos Sudamericanos (CSA), que constituyen la mayor riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas de Sudamérica (Fernández, 2005). La alpaca (*Vicugna pacos* Linnaeus, 1758) atraviesa difíciles situaciones propias de su entorno, como poca disponibilidad de pastos o el frío intenso, las cuales sortea gracias a su gran capacidad adaptativa (Alfaro, 2006). Los rebaños de alpacas sufren limitaciones tecnológicas en la crianza y comercialización de los subproductos, como carne o fibra, y si incluimos la alteración ambiental en muchas de las zonas de crianza donde se encuentran, el resultado solo va sumando más obstáculos para los criadores de alpacas (Jiménez *et al.*, 2010).

En el Perú la minería y el sector agropecuario, pese a ser actividades excluyentes, frecuentemente comparten un mismo espacio territorial, donde los hogares rurales y criadores de ganado son expuestos a la minería (Del Pozo y Paucarmayta, 2015), ya que la actividad minera origina diferentes residuos (pasivos ambientales) por la gran cantidad de procesos que posee, poniendo en peligro a los individuos que habitan sus proximidades (Sinitsky *et al.*, 2016). La contaminación ambiental ocasionada por pasivos ambientales merece un gran interés científico y social, al involucrar no solo la diversidad genética del país sino también la salud y la economía de las personas que dependen de la crianza de animales de granja, incluyendo a la alpaca.

Para mitigar los riesgos del daño que se puedan estar ocasionando en individuos cercanos a minería es necesario conocer el tipo de daño presente y el nivel biológico en el que sucede (Rodríguez, 2003). En cuanto al daño genético, este puede tener consecuencias mutagénicas, teratogénicas o carcinogénicas, dependiendo del tipo de lesión al ADN (Çok *et al.*, 2011). Existen varias pruebas toxicológicas como el test de micronúcleos, aberraciones cromosómicas, ensayo cometa o la prueba de intercambio de cromátidas hermanas, que pueden medir o estimar el daño que es causado directamente al ADN (Alvarez *et al.* 2015).

El presente trabajo se propone estimar la frecuencia de SCE en linfocitos de sangre periférica en alpacas, que son animales criados al aire libre y de gran distribución en zonas de gran altitud del Perú, lugares donde coincidentemente la actividad minera también se encuentra y de manera creciente (Palomino *et al.*, 2016). Los ejemplares de alpacas muestreadas viven bajo las condiciones ambientales de la zona y expuestas a las sustancias tóxicas derivadas de las minas, la cual podría influir en el incremento de su frecuencia de SCE. La zona estudiada es adyacente a la Mina “Kolpa” ubicada en el distrito de Huachocolpa, provincia de Angaraes, región Huancavelica, esta zona posee varios núcleos de cría de alpaca, de los cuales se utilizó el más cercano a la mina en cuestión a la zona de pastoreo.

El presente estudio pretende realizar una investigación descriptiva cuyos datos obtenidos pueden ser utilizados en posteriores investigaciones que traten temas toxicológicos de la zona o estudios que involucren a la especie estudiada en otro tipo de ambiente. Es importante recalcar que este trabajo probablemente sea uno de los primeros estudios que involucra Intercambio de cromátidas hermanas en alpacas realizado en el Perú.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE

4.1.1. Camélidos y su taxonomía

Los camélidos constituyen a la familia Camelidae, son mamíferos que pertenecen al Orden Artiodactilia y se dividen en dos tribus, camelini y lamini ubicados en las zonas de Asia-Africa y Sudamérica respectivamente (Figura 1), el primer grupo está compuesto por dromedarios (*Camelus dromedarius*, Linnaeus, 1758) y camellos (*Camelus bactrianus* Linnaeus, 1758), mientras que los lamini, también conocidos como camélidos sudamericanos (CSA) o auquénidos, están divididos en 4 especies, guanaco (*Lama guanicoe* Müller, 1776), vicuña (*Vicugna vicugna* Molina, 1782), llama (*Lama glama* Linnaeus, 1758) y alpaca (*Vicugna pacos* Linnaeus, 1758) (Jiménez *et al.*, 2010), siendo las dos últimas de crianza domestica desde épocas pre-incaicas (Mengoni, 2008).

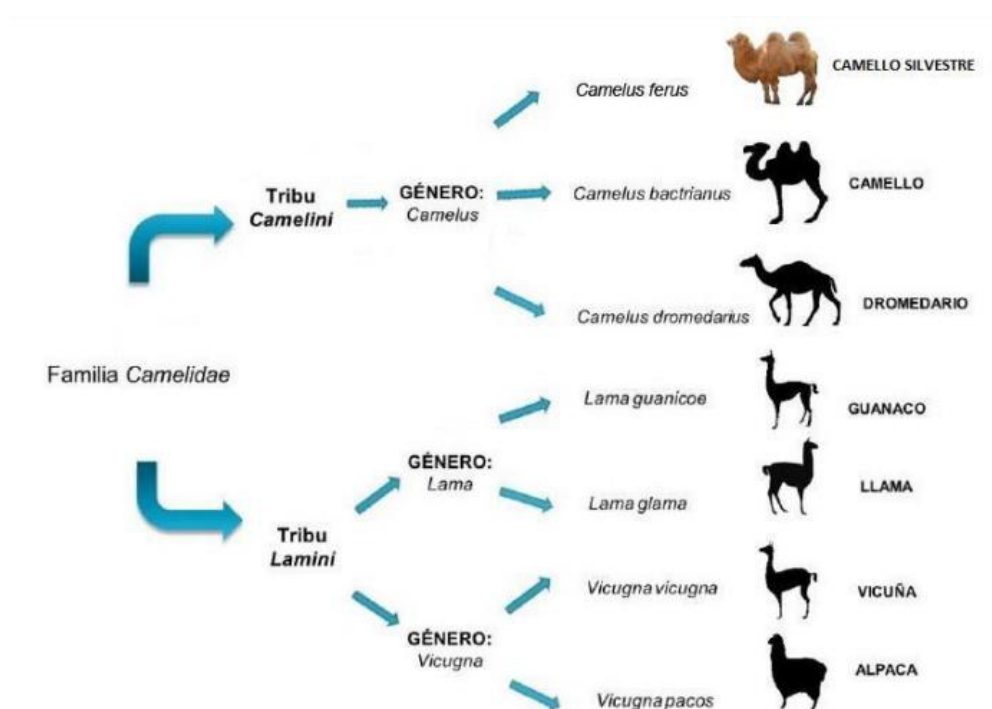


Figura 1. Clasificación de los camélidos. Imagen extraída de Descailleaux (2018),

donde se sugiere la incorporación del camello silvestre (*Camelus ferus*

Przewalski, 1878).

Los camélidos poseen una gran similitud genética a pesar de estar distribuidos por diversos continentes, en un inicio los estudios en su estructura ósea (Wheeler, 1995) permitieron clasificar a estos animales, luego los estudios en ADN mitocondrial modificaron lo descubierto en la filogenia de esta gran familia (Marin *et al.*, 2007). A nivel citogenético Lamini y Camelini presentan un cariotipo casi similar ($2n=74$), considerado muy conservativo (Taylor *et al.*, 1968) con patrones de bandeo C y G muy semejantes (Bunch *et al.*, 1985), la gran conservación entre estas especies se ve reflejada en la existencia de híbridos fértiles, obtenidos de manera natural o asistida (Martinez, 2018).

4.1.2. Alpaca

La alpaca (*Vicugna pacos*, Linnaeus 1758) inicialmente conocida como *Lama pacos* (Linnaeus, 1758) (Kadwell *et al.*, 2001), es uno de los CSA de mayor crianza en el Perú principalmente por la producción de fibra (mal llamada lana). Esta especie presenta dos variedades, “suri” y “huacaya”, representando la última un 80 a 93% del total de la especie (Renieri *et al.*, 2009a; Morante *et al.*, 2009; INEI, 2012). Entre algunas características, la alpaca “suri” presenta un vellón más largo y en rizos que cae por los lados de animal, mientras que “huacaya” posee un vellón esponjoso y corto (Fernández, 2005). La migración humana desde el poblamiento de América fue desplazando a la alpaca desde las zonas costeras hacia regiones altoandinas, sumado a la desarticulación de los sistemas de crianza y clasificación durante la conquista (Renieri *et al.*, 2009b), las alteraciones poblacionales, como el cuello de botella y la hibridación descontrolada entre alpacas y llamas (Wheeler *et al.*, 1992), dieron como resultado el decaimiento de la eficiencia de su ganadería y una mayor presión de selección al vivir en condiciones severas para cualquier especie.

4.1.3. Distribución

El Perú es uno de los mayores productores de camélidos sudamericanos, entre ellos, la alpaca ha acompañado al ser humano desde tiempos pre incaicos, partiendo desde el fin de la colonia, con menos de medio millón de alpacas (Renieri *et al.*, 2009b), hasta llegar a una población actual de alrededor de 3,7 millones de ejemplares (Figura 2), siendo Puno la región con mayor población de alpacas con casi millón y medio de ejemplares, seguido de Cusco y Arequipa (Moreyra, 2018).

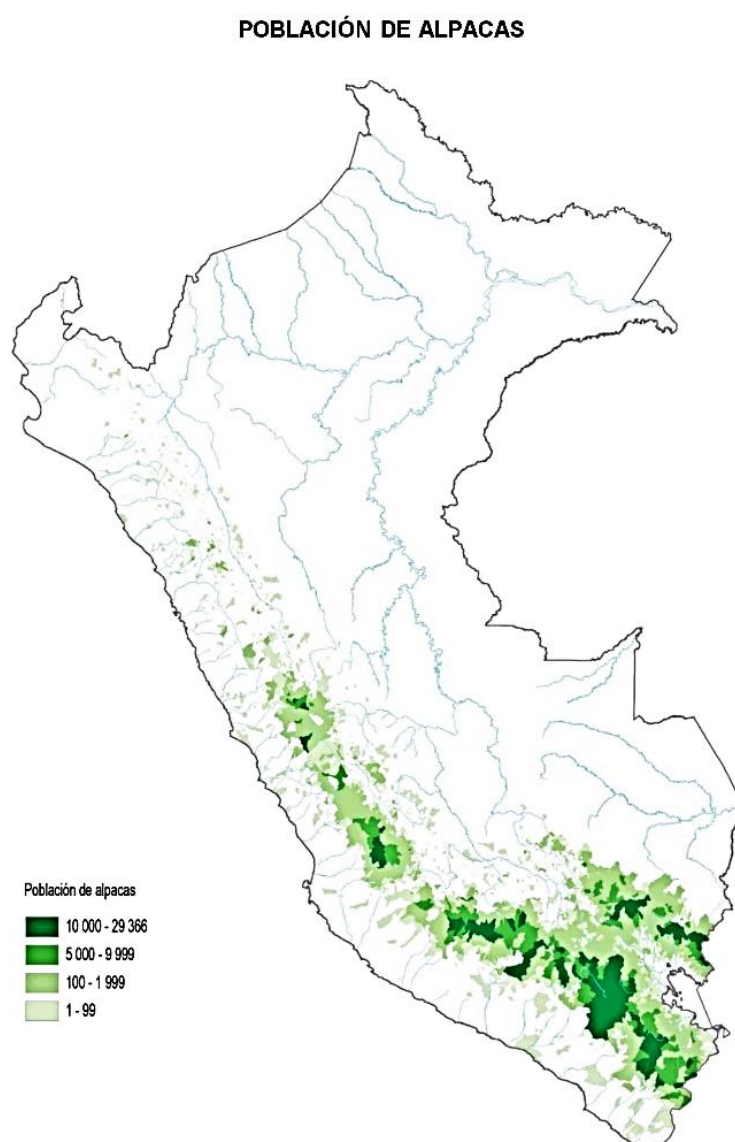


Figura 2. Distribución de alpacas en el Perú. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) - IV Censo Nacional Agropecuario 2012.

Por otro lado, el 37% del territorio de Huancavelica son áreas de pastos naturales y para el mejor aprovechamiento de dichas zonas, se realiza el forrajeo de animales domésticos; gracias a la adaptación a zonas altoandinas y climas fríos, la alpaca, representa una gran mayoría del sector pecuario del departamento (Torres, 2001), es por ello que muchas familias se han dedicado por varias generaciones a la crianza de estos animales, De los Ríos (2006) estimó que un millón y medio aproximadamente de personas se dedican a la crianza de CSA en el Perú, de las cuales las alpacas representa una gran mayoría. Según el Anuario Estadístico “Producción Pecuaria y Avícola 2018”, la población de alpacas en el Perú alcanzó 4 384 846 ejemplares, de los cuales 263 410 estaban presentes en Huancavelica, representando solo un 6% de la población total (MINAGRI, 2018).

4.1.4. Centros de Crianza y Manejo de alpacas

Los sistemas de crianza varían según el productor, llamado “alpaquero”, los cuales pueden gestionar la salud de los animales de manera personal o con el apoyo de veterinarios especializados, también pueden ejecutar rotación de pastos según disponibilidad de terrenos del alpaquero; a nivel reproductivo varios dueños poseen técnicas similares, conservando pocos machos fértiles por rebaño y según los dueños, los emparejamientos y las temporadas de esquila pueden ser realizadas en diferentes fechas. Los productores de alpacas pueden organizarse en distintos tipos o sectores según el número de animales, tecnologías y estrategias de crianza que utiliza cada productor, comunidad de productores o empresas especializadas. Fernández (2005) señaló que los sistemas de crianza pueden ser divididos en tres sectores: El primero, que engloba cerca del 80% de las alpacas pertenecientes a comunidades o minifundios, los cuales se caracterizan por la precariedad de los sistemas de crianza, agrupación en un solo rebaño, de entre 90 a 150 animales aproximadamente, que puede incluir llamas e incluso ovinos o bovinos, el control de sanidad es escaso, artesanal y pocas veces supervisado por los ministerios o entidades encargadas. El segundo tipo representa a

los pequeños y medianos productores que comprende cerca del 10 a 12% de alpacas, ostentan desde 50 a 2000 animales, poseen más tecnologías para el mejoramiento, manejo y salubridad de sus rebaños orientados hacia una gestión rentable, con un trabajo conjunto con organizaciones como, SENASA, mataderos municipales, veterinarios y agrónomos especializados en CSA (Decreto supremo N°015-2012-AG). El tercer y último sector está representado por empresas asociativas, las cuales poseen un nivel tecnológico muy superior a las otras, con sistemas de clasificación por edad, sexo y raza; poseen calendarios, en esquila, rotación de pastos, control de empadre y muchos otros, este último sector cuenta con la ventaja de poseer más presencia en los mercados nacionales e internacionales de carne y fibra de alpaca.

Actualmente se muestra mayor interés de parte de los alpaqueros en la mejora de las características de sus animales, principalmente en función a carne y fibra (Quispe *et al.*, 2009). Vilchez y Meza (2006), manifestaron que el mejoramiento genético en alpacas inició de entre los mismos alpaqueros y aunque ignorasen las bases genéticas implicadas, realizaban la actividad conocida como el “blanqueo de la majada” por medio de emparejamiento de individuos de fibra blanca, como las variedades “suri” y “Huacaya”, y en algunos casos llama, este “blanqueo” se realizaba principalmente para fijar el color, aumentar el peso, la densidad y uniformidad del vellón, sin embargo, Kadwell *et al.*, (2001) informó que mediante los cruces selectivos entre alpacas y llamas, se iba perdiendo la finura que la fibra de alpaca nativa podía ofrecer, ya que la venta de la fibra se realizaba en función al peso, la cual se buscó aumentar; en consecuencia muchas de las ahora llamadas alpacas, presentes en la sierra, poseen genomas de ambas especies. Desde los años 90’s los gobiernos regionales instauraron proyectos de mejoramientos de CSA proponiendo estrategias para la recuperación, conservación y mejoramiento genético, años más tarde surgirían entidades nacionales como el Consejo Nacional de Camélidos (1995) y Organizaciones no gubernamentales (ONG) que promueven la gestión sostenible e investigación en los CSA (Vilchez y Meza, 2006).

4.1.5. Importancia biológica y económica

Desde tiempos antiguos la alpaca fue considerada como un recurso importante, de los cuales se podía obtener alimento, transporte, vestido, leche, huesos, estiércol, entre otros. Más tarde, desde la llegada de la conquista nuevas costumbres y tecnologías desplazó el uso de estos animales hacia zonas de poca accesibilidad, como la sierra del país. Es en los altiplanos donde aún se conserva y protege a la alpaca, manteniéndose antiguas costumbres de crianza, que en la actualidad se fueron mejorando para satisfacer la demanda el mercado nacional e internacional de alpacas y sus derivados (Fernández, 2005)

La demanda mundial de fibra de alpaca está en constante aumento, la más cotizada es la fibra de color blanco, pero la alpaca puede ofrecer muchos otros colores, que va desde tonos cremas y cafés, presentes mayormente en la zona de Huancavelica, hasta grises y negros, en el sur del Perú, todos y cada uno considerados valiosos recursos genéticos (Oria *et al.*, 2009), que con los años despertó el interés de diversas organizaciones para la recuperación de variedades en peligro y posterior conservación en bancos de germoplasma (Huanca *et al.*, 2007). En el mercado mundial la demanda de fibra de alpaca, es 300 veces mayor que la lana de ovinos, pero siempre por debajo de la fibra de vicuña (Brack, 2000), la cual es más fina, y pese a que el mercado mundial crece junto a la calidad de la fibra, el ingreso recibido por los productores va en descenso, costando de 20 a 16,5 soles/Kilo durante el 2018 solo en Puno (Moreyra, 2018).

La carne de alpaca es utilizada por los pobladores para su consumo personal, en preparaciones conocidas como “charqui”, aprovechando las baja temperaturas de la zona para secar la carne, también existen mercados de carne de alpaca fresca donde se comercializan también vísceras y cueros (Alfaro, 2006; Yucra, 2017). Por otro lado, el bajo contenido en grasas intramuscular, alto valor proteico y ácidos grasos omegas 3 y 6, la hacen más favorable frente a la carne de otros rumiantes (Oyagüe *et al.*, 2011), que con el tiempo se busca incluir a esta carne en más recetas cotidianas y

subproductos (De la Torre *et al.*, 2014). Tras muchos años se ha fortalecido un gran mercado de fibra y carne de alpaca, exportando altas cantidades al exterior e interior del país, donde la producción de fibra y carne alcanzó las 23 y 663 toneladas respectivamente solo en Huancavelica el 2018, manteniéndose como uno de los 10 primeros productores de derivados de alpaca a nivel Nacional (MINAGRI, 2018).

En la actualidad, las investigaciones básicas y aplicadas, orientadas al estudio de alpaca van en aumento, con constantes esfuerzos en el mapeo del genoma de la alpaca (Mamani, 2018), encontrar marcadores moleculares asociados a la calidad de la fibra (Florez, 2016; Fernández *et al.*, 2019); también se reportan estudios orientados a la salud humana, como el uso de anticuerpos de cadena única que posee la alpaca para combatir diferentes enfermedades (Barreto *et al.*, 2018), estos y muchos otros estudios futuros convierten a la alpaca y los CSA en valiosos recursos biológicos del Perú.

4.2. DAÑOS AL ADN

4.2.1. Minería en el Perú

La minería es una de las actividades extractivas de mayor explotación en países latinoamericanos, este sector es un pilar importante principalmente por la materia prima metálica para muchos tipos de industrias, que además está fuertemente ligada al sector financiero del país e inevitablemente también al medio ambiente. El Perú posee un gran atractivo en concesiones mineras nacionales y extranjeras (Figura 3), manteniéndose dentro de los 10 primeros exportadores a nivel mundial en oro, cobre, plata, zinc, entre otros (MINEM, 2018). Desde la conquista el Perú ha realizado actividades extractivas (Campos, 2018) y en la actualidad el desarrollo de la industria minera ha generado un reajuste dentro de la estructura económica, demográfica, política, simbólica y de clases de los centros poblados cercanos a las minas (Ramírez, 2018), sin embargo, también ha generado conflictos y graves impactos ambientales al ecosistema donde se ven comprometidos animales, comunidades enteras y población en general (Pinto, 2010).

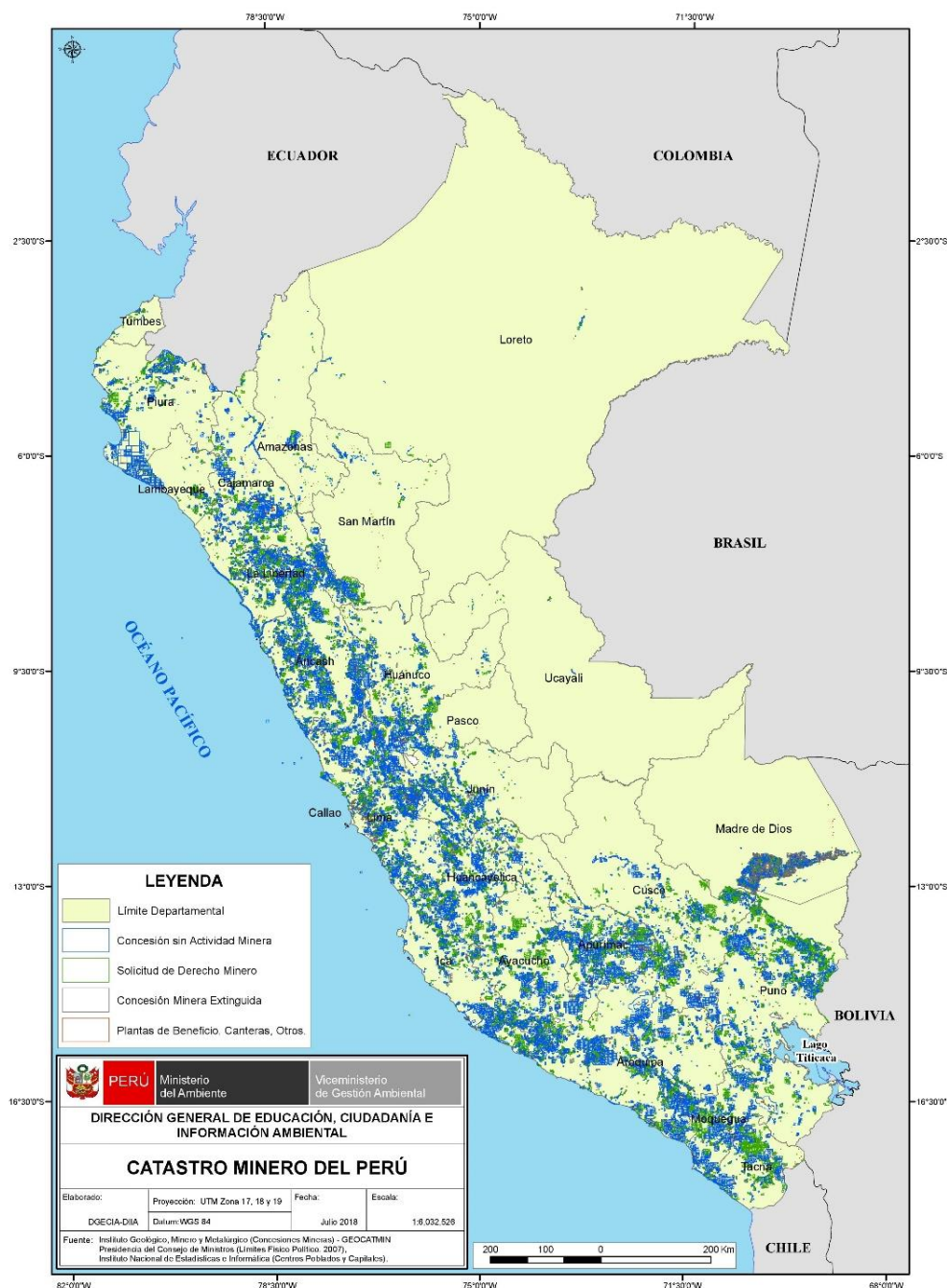


Figura 3. Mapa de concesiones mineras del Perú abril de 2015. Extraído del Dirección General De Educación, Ciudadanía e Información Ambiental (DGE CIA-DIA, 2018).

4.2.2. Contaminación del Ecosistema

Debido a que muchos asentamientos mineros se encuentran zonas cercanas a cuencas o cuerpos de agua natural, los daños ocasionados por los pasivos ambientales derivados de la actividad minera, no solo pueden estimarse con estudios de calidad hídrica; la biodiversidad que rodea ríos y lagunas también se ven comprometidos, es

por ello que el daño posee una mayor amplitud que incluye la desaparición de flora y fauna, aumento de enfermedades respiratorias o dermatológicas en especies cercanas y la degradación del suelo (Herrera y Millones, 2011). Aunque el estado certifica los proyectos mineros desde el inicio de la exploración de zonas extractivas (Figura 4), en la actualidad se van notificando eventos de contaminación accidental de las cuencas de agua cercanas a minas (Pinto, 2010), y pese a ser un recurso natural indispensable para la subsistencia de comunidades humanas no se tiene un buen cuidado de este, principalmente por la ausencia de un buen sistema de multas o sanciones hacia las personas o entidades que lo contaminen (Herrera y Millones, 2011).

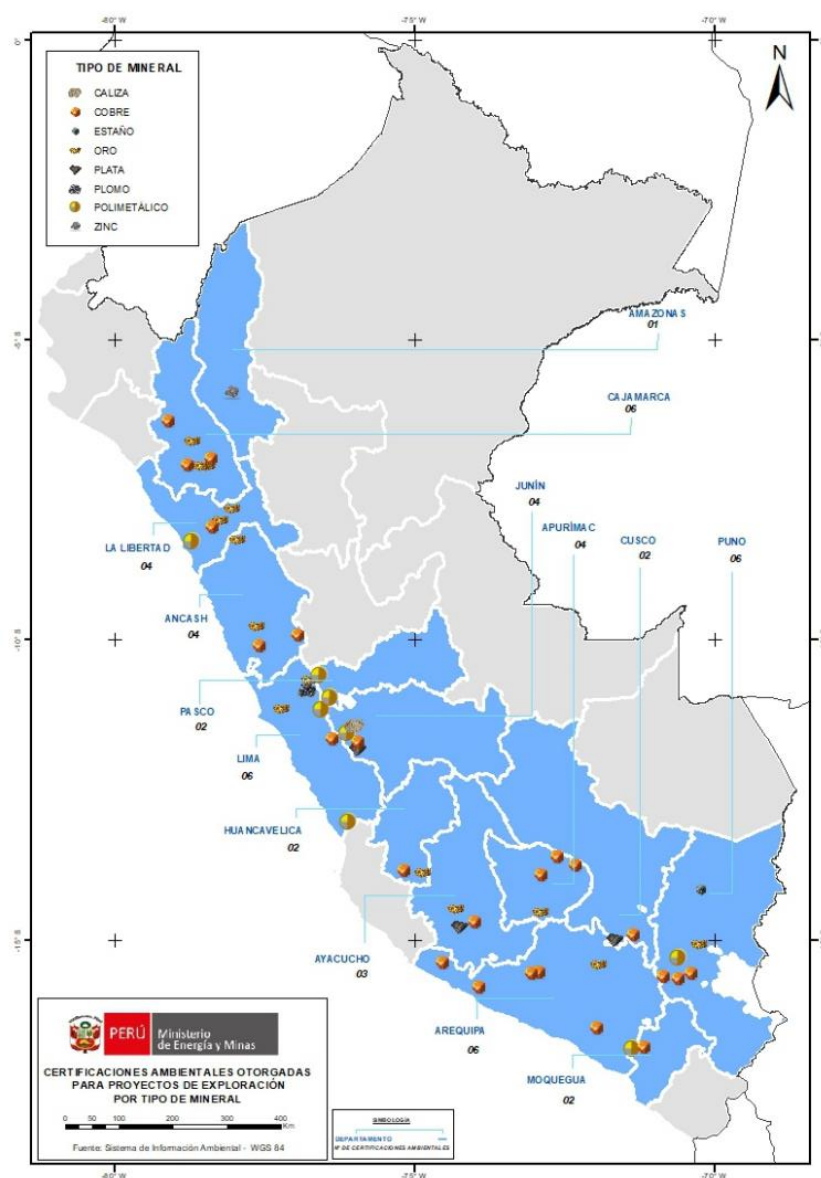


Figura 4. Mapa de las certificaciones otorgadas para proyectos de exploración. Anuario Minero de Perú (2018).

La extracción de grandes cantidades de mineral en forma de tierra y rocas causa que el aire de las zonas aledañas a las minas, especialmente la extracción a tajo abierto, se vea comprometido alterando sus componentes básicos y contaminándolos con metales pesados (Nolasco, 2011), que junto a disponibilidad de vientos pueden llegar a más de 3 km de distancia (Puga *et al.*, 2006; Torres, 2005). El procesamiento y almacenado del mineral extraído puede contaminar los suelos a profundidades donde las raíces de las plantas absorben nutrientes, en especial el almacenado en reservorios conocidos como “relaveras”, donde distintos metales pesados pueden escapar y alterar el balance natural de los suelos (Pérez, 1999; Puga *et al.*, 2006), los cuales necesitan ser sometidos a procesos de remediación para recuperar zonas de pastoreo.

4.2.3. Evaluación del daño ocasionado

Como ya se ha comentado, la presencia de metales pesados en el sistema hídrico, suelos y aire se desplazan a otros niveles, ya sea por absorción de las plantas contaminadas o por el consumo directo de agua, la intrusión de metales trazas en animales generaría efectos tóxicos que dependerían del tipo y concentración del material (Nolasco, 2011; Reyes *et al.*, 2016). Es imperante conocer el daño que se causa a distintos individuos y realizar labores de control o remediación para mitigar futuras consecuencias. Existen los estudios de impacto ambiental (EIA) que describen y evalúan los tipos de impacto que un proyecto generará antes, durante y después del proyecto, estos poseen muestreos de animales para evaluaciones de densidad poblacional (Espinoza, 2001; Dellavedova, 2011), pero carecen de estudios concretos que estimen el daño en las especies estudiadas, principalmente por falta de especialistas en todas las disciplinas que deberían estar involucradas en estos estudios (Coria, 2008).

4.2.4. Pruebas de evaluación genotóxica

En la Tabla 1 Álvarez et al. (2015) recopilaron una serie de técnicas de estudio para la evaluación de daño al ADN, resaltando las ventajas y desventajas de cada prueba basadas en el costo y complejidad de las mismas. De entre todas las pruebas se resalta el uso de las técnicas citogenéticas, por la baja complejidad y la ventaja de poder evidenciar los efectos biológicos de los xenobióticos y agentes contaminantes antes de la aparición de alguna enfermedad (Udroiu, 2007).

Metodología	Ventajas	Desventajas	Costo	Observaciones	Ejemplo de uso en animales de producción
<i>Test de Micronúcleos</i> (MN)	Metodología simple. Validado mundialmente. Indicador indirecto de rotura cromosómica	Sólo para células proliferativas. Se necesita conocer cinética de división celular	Bajo	Microscopio de campo claro	Šutiaková <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2012; Šivíková <i>et al.</i> , 2013
<i>Test de Aberraciones Cromosómicas</i> (AC)	Metodología simple	Requiere observador experimentado	Bajo	Microscopio de campo claro	Udroiu 2007; Shekhar <i>et al.</i> , 2014
<i>Test de Retardo en Anafase-Telofase</i> (RAT)	Metodología simple	Requiere observador experimentado. Baja sensibilidad	Bajo	Microscopio de campo claro	Mudry <i>et al.</i> , 1995
<i>Test de Intercambio de Cromátidas Hermanas</i> (ICH)	Metodología simple	Requiere observador experimentado.	Bajo	Microscopio de campo claro	Udroiu, 2007
<i>Ensayo Cometa</i>	Requiere bajo número de células. Células proliferativas y no proliferativas	Baja reproducibilidad. Técnica laboriosa. Requiere observador experimentado. No detecta efectos aneugénicos. No estandarizado		Cuba de electroforesis. Microscopio de fluorescencia. Provee información de células individuales	Rodrigo <i>et al.</i> , 2005; Udroiu, 2007; Belletti y Mello, 2009
<i>In situ nick translation assay</i> (ISNT)	Detecta daño directamente.	Baja reproducibilidad. Requiere operador experimentado		Microscopio de campo claro. Microscopio de fluorescencia. Citometría de flujo	Nava-Trujillo <i>et al.</i> , 2012; Santiani <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1. Comparación de diferentes técnicas toxicológicas, incluye a técnicas citogenéticas, Test de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y Test de intercambio de cromátidas hermanas. Obtenida de Alvarez et al. (2015).

4.2.5. Especie centinela para evaluar condiciones ambientales espacio-temporales.

La predisposición a algunas enfermedades producidas por el contacto a contaminantes en el ambiente es un hecho de importancia para el ser humano, sin embargo, se puede realizar la misma prueba en especies modelos que estén expuestas *in situ* a la contaminación, estos animales son conocidos como individuos centinelas, los cuales son sensibles al daño provocado en su entorno (Regoli *et al.*, 2005), esto permite monitorear las condiciones ambientales que ostente una zona determinada y estimar los niveles de concentración de partículas, como microplásticos en los animales marinos (Beyer *et al.*, 2017), contaminación aérea por polución industrial (Somers, 2011), o monitoreo en suelos contaminados por diversos mutágenos (Verschaeve *et al.*, 1995). Estos organismos centinelas por lo general deben ser animales que estén distribuidos de manera natural en la zona de interés, de los cuales se pueda obtener muestras para realizar distintos tipos de pruebas toxicológicas que nos indiquen la situación ambiental a la que esté sometido el organismo (Poletta *et al.*, 2008).

4.3. ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

4.3.1. Historia

El intercambio de cromátidas hermanas o SCE fue observado por primera vez por Taylor *et al.* (1957), al tratar de demostrar la naturaleza semiconservativa de la replicación del ADN, aunque fue predicha muchos años antes por McClintock en 1938 mediante la observación del comportamiento de cromosomas dicéntricos en anillos en células somáticas del maíz (Korenberg *et al.*, 1974). Taylor (1958) estandarizó el protocolo de obtención de SCE en cultivos de células vegetales en plantas marcadas con timidina tritiada y técnicas autoradiográficas, este procedimiento otorgaba un análisis limitado al no ser adecuado por las técnicas de la época. Más tarde, Zakharov y Egoлина (1972) encontraron un reemplazo para la timidina tritiada llamado 5-Bromodesoxiuridina (BrdU), utilizado para diferenciar una de las cromátidas, sustituyendo en la cadena de ADN a la

Timidina por el 5-Brdu, donde tras dos ciclos de replicación se lograría una diferenciación entre ambas cromátidas hermanas, el procedimiento permitía la observación de los cromosomas sin la necesidad de utilizar radioisótopos y autoradiografía. Posteriormente Latt (1974a) descubrió como la fluorescencia de Hoechst 33258 permite un mejor análisis microfluorométrico de los SCE en metafases humanas, a la par Perry y Wolff (1974) combinaron la utilización de Giemsa con Hoescht 33258, lo cual permitió obtener cromosomas “arlequín” de mayor nitidez y sin la necesidad de microscopios de fluorescencia.

4.3.2. Formación de los SCE

Los intercambios entre las cromátidas hermanas ocurren durante la fase S del ciclo celular, donde se replica la hebra madre y forma dos hijas compactadas en las cromátidas hermanas unidas por el centrómero, hasta la fecha se conoce poco de los mecanismos moleculares que están inmersos en el proceso (Wilson y Thompson, 2007), pero está estrechamente relacionada con la síntesis de ADN (Latt, 1974b), se tiene dos modelos que explican su formación, un modelo que involucra a los SCE durante la replicación del ADN (Painter, 1980; Ishii y Bender, 1978) y otro que ubica los SCE después de la replicación del ADN (Kato, 1977). El modelo más aceptado de la formación de SCE es el que se da durante la replicación, que involucra rompimiento de la doble cadena de ADN, la participación de topoisomerasas y otras proteínas relacionadas al mecanismo de reparación de ADN (Arnaudeau *et al.*, 2001; Raynard *et al.*, 2006; Wilson y Thompson, 2007).

4.3.3. Factores que alteran la frecuencia del SCE

Existen diversos factores que modulan el incremento de los SCE, de entre ellos se puede mencionar el tipo celular, la capacidad para metabolizar diversas sustancias, grado e intensidad de exposición a diferentes agentes tóxicos, entre otros, por ello Latt (1981) compiló varios agentes que generan daño al ADN e inducen SCE (Tabla 2), los agentes alquilantes del ADN, como el Metanosulfonato de etilo (EMS) son de los más

efectivos y estudiados que alteran los índices de SCE, la mitomicina C (MMC) es una sustancia alquilante que como muchas de su tipo ocasionan monoadductos en el ADN que alteran la replicación del ADN (Stagos *et al.*, 2007), algún otro conjunto de sustancias químicas derivadas del humo de incendios como hidrocarburos aromáticos policíclicos (Liou *et al.*, 1989) o polución del parque automotor (Chandrasekaran *et al.*, 1996), también puede alterar los SCE.

TIPO	SUSTANCIA
Agentes alquilantes	EMS, MMC u otros
Colorantes que se unen al ADN	Daunorrubicina
Bases análogas	BrdU
Irradiaciones	BrdU + Luz UV
Virus	SV40
Otros	Acetaldehído

Tabla 2. Diferentes agentes que exhiben fuerte inducción de SCE

La radiación ionizante produce roturas de doble cadena en el ADN, llegando a provocar aberraciones cromosómicas y muerte celular, pero se tiene antecedentes de que también induce la formación de SCE (Conrad *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2001). Las bases análogas como el BrdU pueden llegar a inducir SCE (Wójcik *et al.*, 2004), la exposición al genoma o anticuerpos de origen viral también pueden generar SCE (Kamranvar y Masucci, 2011), al igual que algunos trastornos genéticos o enfermedades autoinmunes (Honma *et al.*, 2002; Ikbal *et al.*, 2006).

4.3.4. Ensayo de SCE

Esta prueba puede llevarse a cabo en sistemas *in vivo* e *in vitro*, en cualquier línea celular eucariota superior o cepa celular que normalmente se replique o pueda hacerse replicar, es por ello que se utilizó diversos modelos biológicos, pasando desde *Drosophila* hasta seres humanos (Tucker *et al.*, 1993), el requerimiento mínimo es que la célula incorpore un análogo de algún nucleótido, como la timidina tritiada, BrdU o biotin-dU (Wójcik y Smalec, 2012), durante dos eventos replicativos.

4.3.5. Cultivo celular

Para aumentar la densidad celular y obtener suficientes metafases se recurre a la estimulación de la mitosis en linfocitos de sangre periférica, para ello se utiliza mitógenos obtenidos de otras especies. como las lectinas. fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* o Concanavalina A de *Canavalia ensiformes*, esta última utilizada para la mayoría de mamíferos por ser tan efectiva como la primera, pero menos costosa (Iannuzzi y Berardino, 2008). En el ciclo celular, durante la fase S la carga genética debe duplicarse, por ello el ADN se replica generando cromosomas con dos cromátidas hermanas de contenido exactamente igual (Wilson y Thompson, 2007), estos pueden observarse mucho mejor durante la profase tardía, como filamentos largos, o la metafase temprana como cromosomas más condensados idóneos para bandeos C, G, R y otros (Iannuzzi y Di Berardino, 2008).

4.3.6. Sustitución de la Timina por Brdu durante la replicación

Gracias a que la replicación del ADN es semiconservativa, el Brdu puede incorporarse dentro de las cadenas de ADN hijas en cada duplicación, esto sucede por la capacidad competitiva del Brdu frente a la timidina la cual es reemplazada (Wilson y Thompson, 2007). La adición del Brdu debe realizarse durante dos ciclos de replicación, para obtener una cromátida unifilarmente sustituida (BT) y otra bifilarmente sustituida (BB), se debe tener cuidado que la concentración no exceda las recomendadas ya que esta puede inducir el aumento de SCE, generando falsos positivos (Latt, 1981).

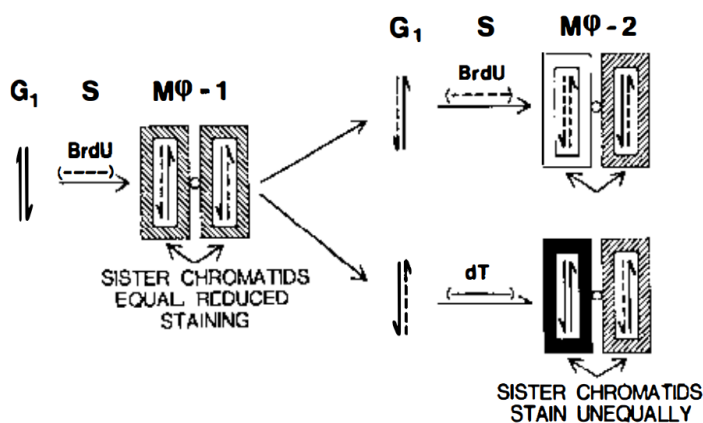


Figura 5. Diferenciación de las cromátidas hermanas por medio de la adición de Brdu.

Imagen obtenida de Latt (1981).

La detección de los SCE requiere la tinción diferencial de las cromátidas hermanas, en la figura 5, las líneas continuas representan las cadenas madres de ADN que al ser semiconservativas solo son repartidas a cada cadena hija durante la fase S (S), mientras se crea las cadenas complementarias donde la timidina es sustituida por el Brdu, líneas discontinuas, para un segundo ciclo de replicación en presencia de Brdu se puede notar las cromátidas BT y BB, adicionalmente en caso de eliminar el Brdu del cultivo durante la segunda duplicación (dT) aparece una cromátida sin bromosustitución (TT) (Latt, 1981).

4.3.7. Duración de la respuesta de SCE

La inducción de SCE en un sistema *in vitro* puede verse disminuida con el pasar de los ciclos celulares en los que se mantiene el cultivo (Miller *et al.*, 1976; Lazutka y Dedonite, 1990), además que la exposición periódica genera menos SCE que la exposición constante al agente toxico (Murthy, 1979), periodos cortos pero constantes de fármacos solo se mantienen por pocos días en sistemas *in vivo*, (Nevstad, 1978). Estos antecedentes indican que es mejor estudiar la respuesta de SCE en una población que se encuentre expuesta de manera constante y prolongada a un mutágeno cancerígeno.

4.3.8. Test de SCE para evaluar Genotoxicidad Ambiental

Las investigaciones en SCE se han realizado a lo largo de estos últimos 50 años en una alta variedad de eucariotas superiores y al estar íntimamente relacionada con la reparación del ADN posee una gran capacidad para estimar el daño genético producido por diferentes agentes genotóxicos (Çelik y Akbas, 2005; Yi y Si, 2007), por ello, la prueba de SCE es muy útil para el estudio de genotoxicidad en poblaciones expuestas a múltiples contaminantes ambientales, tanto en su identificación como en concentración (Pérez-Cadahía *et al.*, 2006; Tapisso *et al.*, 2009). Ocasionalmente los estudios de SCE van acompañados con otras pruebas citogenéticas como

micronúcleos, aberraciones cromosómicas o ensayo cometa para reforzar los resultados obtenidos (Cardoso *et al.*, 2001).

5. HIPÓTESIS

5.1. HIPÓTESIS NULA

La proximidad de un centro de crianza de alpacas a zonas de explotación de mineras, puede incrementar la media de intercambio de cromátidas hermanas de linfocitos de su sangre periférica.

5.2. HIPÓTESIS ALTERNA

La proximidad de un centro de crianza de alpacas a zonas de explotación de mineras, no altera la media de intercambio de cromátidas hermanas de linfocitos de su sangre periférica.

6. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Estimar la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos de sangre periférica de una población de alpacas ubicada en la localidad de Huachocolpa, región de Huancavelica.

OBJETIVO ESPECIFICO

- Estimar la frecuencia de SCE en linfocitos de sangre periférica de las alpacas estudiadas.
- Comparar los datos obtenidos con otras poblaciones de linfocitos en animales cercanos filogenéticamente disponibles (*Camelus dromedarius*).
- Estimar la frecuencia de los eventos de SCE en los cromosomas de linfocitos de sangre periférica de alpacas estudiadas.

- Estimar la ubicación de los SCE en los cromosomas de los linfocitos de sangre periférica de alpacas estudiadas.
- Comparar las frecuencias de SCE entre las alpacas machos y hembras.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. POBLACIÓN

La zona de muestreo está ubicada a la entrada del distrito de Huachocolpa, anexo Totorá, Provincia de Angaraes, Departamento de Huancavelica, la zona está ubicada a 4480 m.s.n.m. en las coordenadas 13°04' 86" Sur, 74° 59' 34" Oeste a 4 horas de viaje desde la capital del departamento (Ciudad de Huancavelica) a través de una carretera afirmada.

Las actividades se realizaron temprano a las 8 de la mañana durante unas 3 horas, para que las alpacas cubran su alimentación diaria, es importante señalar la presencia y asesoría de un veterinario con amplia experiencia en el trato de alpacas y llamas, de la misma manera, también se contó con la presencia del dueño de las alpacas, ambos seleccionaron cada uno de los animales utilizados según los criterios de inclusión que se plantearon en el proyecto de tesis.

- **Criterios de inclusión (determinados por Veterinario)**

- Individuos aparentemente sanos
- Individuos en etapa reproductiva
- Individuos que hayan permanecido consumiendo pastos y agua más de un año en la zona.

- **Criterios de Exclusión**

- Individuos sometidos a tratamientos con algún fármaco.

- **Criterios de Eliminación**

- Muestras que no hayan tenido un buen crecimiento que nos permita obtener suficientes metafases para realizar la prueba.

7.2. TÉCNICA

Protocolo de Intercambio de Cromátidas Hermanas (Ramos *et al.*, 2014)

7.2.1. TOMADE MUESTRA

Se extrajeron 6ml de sangre periférica por punción de la arteria femoral de las extremidades posteriores de las alpacas, la toma de sangre se realizó utilizando el sistema Vacutainer, con desinfección de la zona de extracción con alcohol de 96° y alcohol yodado. Se muestrearon 21 alpacas (entre machos y hembras) del mismo rebaño conformado por 100 animales, todo el rebaño permaneció gran parte de su vida en la zona donde el cobertizo y el área de pastoreo se encuentra aproximadamente a menos de 800 metros del centro minero “Kolpa”, antes mina “Caudalosa”.

7.2.2. SIEMBRA

Todos los procedimientos se realizaron en una cabina de flujo laminar, con esterilización a través de radiación ultravioleta durante 15 minutos de todos los materiales a excepción de las muestras y reactivos (medios, suero, antibióticos, heparina). Media hora antes del cultivo se temperó los reactivos utilizados.

En un tubo de centrifuga estéril con tapa rosca de 15 mL, se adicionaron los siguientes reactivos, 6 mL de medio 199, 220 µL de suero concanavalina A (1 mg/mL), 2 mL de suero bovino fetal SBF, 50 µL de estreptomicina, 50 µL de anti – anti (antifungicida y antibacteriano), 2 gotas de Heparina sódica y al final 1 mL de sangre periférica total homogenizada por inmersión. Una vez adicionado todos los reactivos se homogenizó lentamente, se rotuló cada tubo con el código de identificación de cada animal muestreado y se colocó parafilm en las tapas de cada tubo.

7.2.3. ADICIÓN DEL BRDU

A las 46 horas de realizada la siembra, se agregó a cada tubo de cultivo 100ul de 5-Brdu a una concentración de 10 µg/mL, se cambió el parafilm de las tapas y se dejó incubando nuevamente en la estufa a 37 °C hasta completar sus 72 horas de cultivo.

PREPARACIÓN CITOLÓGICA

La preparación citológica se realizó de manera muy cuidadosa ya que es crucial para la obtención de las láminas con la muestra, cromosomas metafísicos o prometafásicos, limpios, sin presencia de citoplasma, y extendidos con pocas o nulas sobreposiciones para su buena lectura.

7.2.4. ADICIÓN DE LA COLCHICINA

A las 71 horas y media de realizada la siembra se adiciono 120 μ L de Colchicina a una concentración de 1 μ g/mL y se coloca nuevamente a la estufa por 30 minutos a 37 °C.

7.2.5. HIPOTONIZACIÓN

A las 72 horas de la siembra se colectaron los tubos para su centrifugación a 400 g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y conservó el pellet, luego se adicionó 10 mL de solución hipotónica KCl (0.075 M), se homogenizó e incubó a 37 °C por 20 minutos en el baño maría

7.2.6. PRE - FIJACIÓN

Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de solución Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) frio y recién preparado, luego lentamente se homogenizó para uniformizar el contenido, se centrifugaron los tubos a 400 g por 10 minutos.

7.2.7. FIJACIÓN

Se retiró el sobrenadante, se agregó Carnoy hasta los 7 mL y se homogenizó moderadamente, luego se llevó los tubos a refrigeración a 4° C por 30 minutos. Una vez transcurridos comienzan la etapa de los lavados utilizando 5 mL solución Carnoy en cada uno. Finalmente se guarda la muestra en 0.5 mL de solución Carnoy para la preparación de láminas (muestra “stock”).

7.2.8. PREPARACIÓN DE LAMINAS

Las láminas portaobjetos fueron lavadas y desengrasadas cuidadosamente usando una pequeña cantidad de detergente Alconox y múltiples enjuagues con agua corriente y luego agua destilada, luego fueron sumergidas en una solución de alcohol al 96 %: agua

destilada (1:1) y se colocaron a -20 °C en la congeladora hasta que la lámina portaobjetos haya formado una capa de hielo.

Usando las muestras stock de cada animal, se resuspende el botón celular con una pipeta Pasteur de vidrio única para cada muestra. Se agregan 5 gotas en toda la extensión del portaobjetos previamente preparado, las gotas deben ser lanzadas a una altura considerable (30cm) entre la lámina y la pipeta Pasteur. Se expuso la lámina a un mechero por el lado que no contiene la muestra dando movimientos oscilatorios y distribuyendo el calor a lo largo de toda la lámina sin dejar que el calor exceda el soportado por la piel humana.

7.2.9. TINCIÓN DIFERENCIAL

Las láminas se prepararon al momento para su uso, luego se adicionaron 8 gotas de Hoechst 33258 sobre el portaobjeto para uniformizar las gotas en toda la superficie del cubreobjetos que contiene la preparación citológica, luego se cubrió con una laminilla cubreobjetos durante 20 minutos a temperatura ambiente, culminado el tiempo se retiró la laminilla, luego se enjuagó con agua destilada por ambos lados de manera vigorosa y se dejó secar.

A continuación, se agregó 8 gotas de 2xSSC pH 7 a lo largo de la lámina y se cubrió con un cubreobjetos para uniformizar las gotas en todo el portaobjetos, luego se expuso a la lámina a radiación ultravioleta de 254nm por 30 minutos a 8 cm de distancia de la lámpara UV. Luego se retiró el cubreobjetos y se lavó con agua destilada ambas caras de la lámina, dejarla secar y colorear con Giemsa 3% buffer fosfato pH 6.8 por 6 minutos.

7.3. MEDICIONES

7.3.1. ÍNDICE DE SCE

Se revisaron todas las metafases disponibles hasta completar 20 del segundo ciclo de replicación que posean los siguientes criterios de selección para la fotografía:

- Metafasas en lo posible sin cruces de cromosomas
- Metafasas que tengan los cromosomas completos ($2n=74$).
- La coloración diferencial de las cromátidas debe ser nítida.

7.3.2. PUNTUACIONES DE SCE EN CADA CROMOSOMA ESTUDIADO

Se revisó cada cromosoma de las 20 metafases de todas las alpacas utilizadas en este estudio, registrando cuantos intercambios posee cada cromosoma según las clases mostradas en la figura 6, independientemente de la ubicación en cada brazo o centrómero.

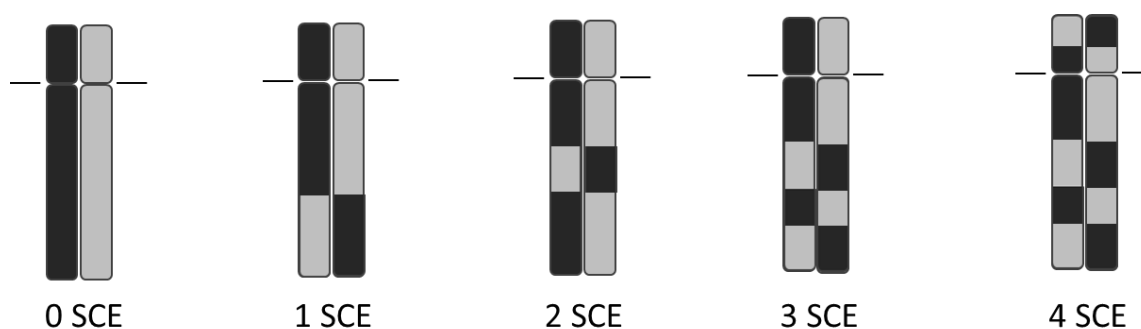


Figura 6. Esquematización de cromosomas obtenidos mediante la adición de BrdU. Nótese las clases de cromosomas según el número de SCE que presenten, estos pueden ir desde, sin SCE (clase 0), 1 SCE (clases 1), 2 SCE (clases 2), 3 SCE (clase 3) y 4 SCE (clase 4).

7.3.3. UBICACIÓN DE LOS SCE EN EL CROMOSOMA

Se examinaron los 74 cromosomas de las 20 metafases de todos los animales estudiados, registrando la ubicación de los SCE en los cromosomas, solo consideró el brazo p (corto) y brazo q (corto) y la distancia del evento de SCE al centrómero, estableciendo la categoría de SCE intersticial, como SCE que se mantienen en la región media; SCE terminal, entendiéndose como más lejano al centrómero casi en la región

telomérica y SCE proximal, adyacente a la zona centromérica, como se explica en la figura 7.

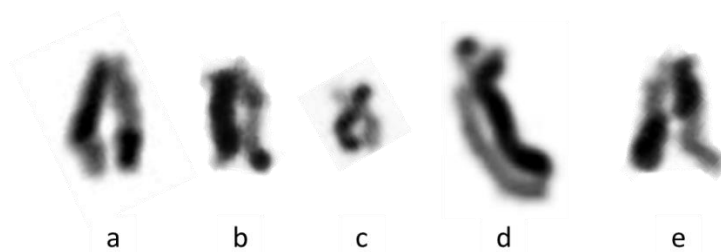


Figura 7. Ubicación de los SCE en los cromosomas, en “a” se muestra un SCE intersticial, en “b” un SCE terminal, en “c” un SCE proximal, en “d” un SCE en el brazo P y en “e” un SCE en el brazo Q (Según lo reportado en Raposo *et al.*, 2004).

7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de SCE se analizaron mediante una prueba de varianza unidireccional (Test de Kruskal-Wallis) para determinar si algunos grupos de alpacas diferían significativamente de los otros ($\alpha = 0.05$), ya que los datos no poseían una distribución normal al realizar la prueba Shapiro – Wilks, adicionalmente, se realizó una prueba de Tukey para determinar que grupos diferían significativamente de otros. Se realizó una prueba de bondad de ajuste para determinar si los SCE siguen la distribución de Poisson, esta se realizó con toda la muestra, machos y hembras. Para la búsqueda de diferencias significativas entre las alpacas machos y hembras, en los conteos de SCE se utilizó la prueba de Mann-Whitney y para los tipos de SCE se usó la prueba Chi cuadrado.

8. RESULTADOS

8.1. Muestreo realizado

Se obtuvieron muestras de 21 alpacas, todas de la variedad Huacaya, de un solo rebaño de 90 animales y ubicadas en el anexo Totorá del distrito de Huachocolpa – Huancavelica, con edades de 2 años (10%), 3 años (25%), 4 años (40%) y 5 años (25%), todas cuidadosamente seleccionadas por el veterinario y el dueño de los animales. En la tabla 3, se exhiben los resultados de 5 machos y 16 hembras todas de la variedad

Huacaya, obtenidas del mismo establo (CHIPCHILLAY), adicionalmente por información del dueño, se reportó el número de crías en las hembras para confirmar su fertilidad.

Código	Sexo	Edad (años)	Establo	Especie	Raza	Estado	Alimento	N° de crías
A1	HEMBRA	5	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	3
A2	HEMBRA	4	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	3
A3	HEMBRA	4	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	2
A4	HEMBRA	4	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	3
A5	HEMBRA	4	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	3
A6	HEMBRA	4	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	3
A7	HEMBRA	4	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	2
A8	MACHO	4	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sano	Pastos	---
A9	MACHO	2	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sano	Pastos	---
A10	MACHO	2	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sano	Pastos	---
A11	MACHO	5	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sano	Pastos	---
A12	HEMBRA	5	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	0
A13	HEMBRA	5	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	1
A14	MACHO	3	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sano	Pastos	--
A15	HEMBRA	4	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	2
A16	HEMBRA	3	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	1
A17	HEMBRA	3	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	0
A18	HEMBRA	3	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	0
A19	HEMBRA	3	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	0
A20	HEMBRA	5	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	2
A21	HEMBRA	5	CHIPCHILLAY	<i>V. pacus</i>	Huacaya	Sana	Pastos	2

Tabla 3. Información básica de las alpacas muestreadas en la localidad de Huachocolpa

Todas las alpacas pertenecientes al criadero muestreado realizaban el pastoreo muy cerca de su establo y a la vez cerca de la minera “Kolpa”, antes conocida como “Caudalosa” (Figura 8).

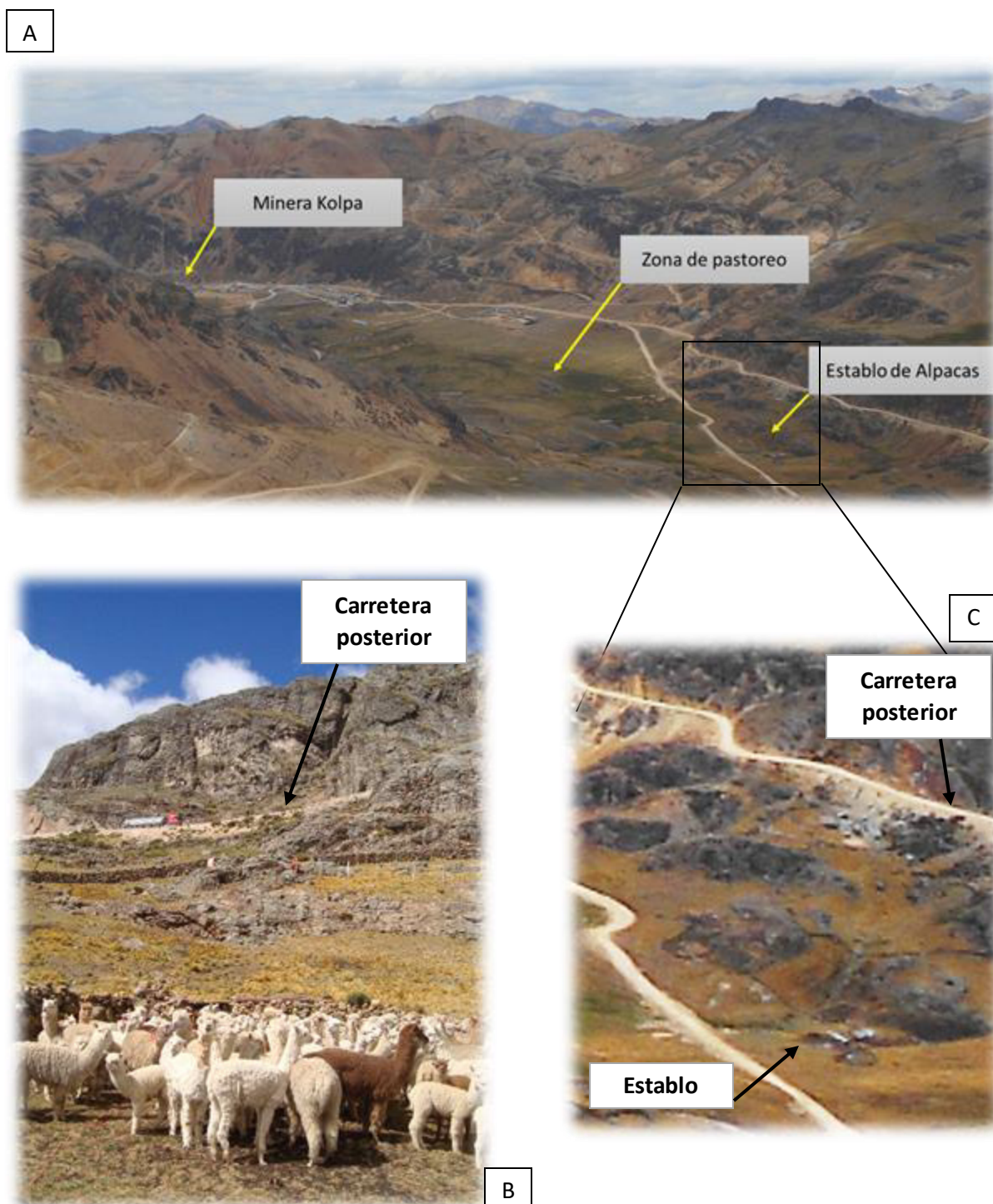


Figura 8. Zona de muestreo; en la parte A se muestra la zona entera que engloba al establo de las alpacas, la zona de pastoreo a 500 m. aproximadamente del establo y la relavera más cercana a 1000 m. de la zona de pastoreo (mediciones realizadas con Google Earth). En la parte B se ven las alpacas del establo y la carretera posterior donde circulan camiones que transportan el mineral extraído levantando polvareda en la zona. En la parte C se aprecia el establo que muestra las dos carreteras que rodean al mismo.

8.2. Referente al efecto de BrdU en las metafases observadas

Se observaron diversas metafases con incorporación de BrdU durante 2 ciclos replicativos consecutivos, esta se puede confirmar por la coloración diferencial entre las cromátidas hermanas BB y BT, las cromátidas BB están más débilmente teñidas que las cromátidas BT y en algunos casos exhiben mayor longitud que las BT (Figura 9). El análisis computacional después de realizada la toma fotográfica de las metafases de interés nos permito realizar el conteo total de cromosomas y el número de SCE en cada metafase observada, siempre según los criterios de selección anteriormente señalados (figura 11). Durante la búsqueda de metafases óptimas para el conteo, se llegó a encontrar 15 metafases con roturas cromatídicas (figura 10), las cuales no se consideraron en el conteo, varias de ellas se presentaron en su mayoría en el brazo largo del cromosoma, ninguna sobre el sitio de intercambio, pero si cercano, el número de roturas cromatídicas encontradas fue escasa para considerar su conteo, además de no ser objetivo de este trabajo.

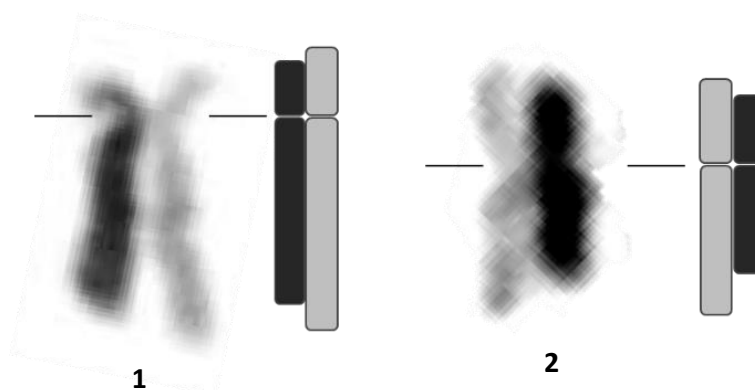


Figura 9. Cromosomas mitóticos de alpacas después de la incorporación de BrdU durante dos ciclos de replicación y teñidos con Hoescht 33258 y Giemsa. Cada cromosoma es mostrado junto a un idiograma que esquematiza la diferencia de longitudes la cual es más evidente en cromosomas sin SCE. (1) y (2) pertenecen a las metafases codificadas como image0069 y image0168 respectivamente.

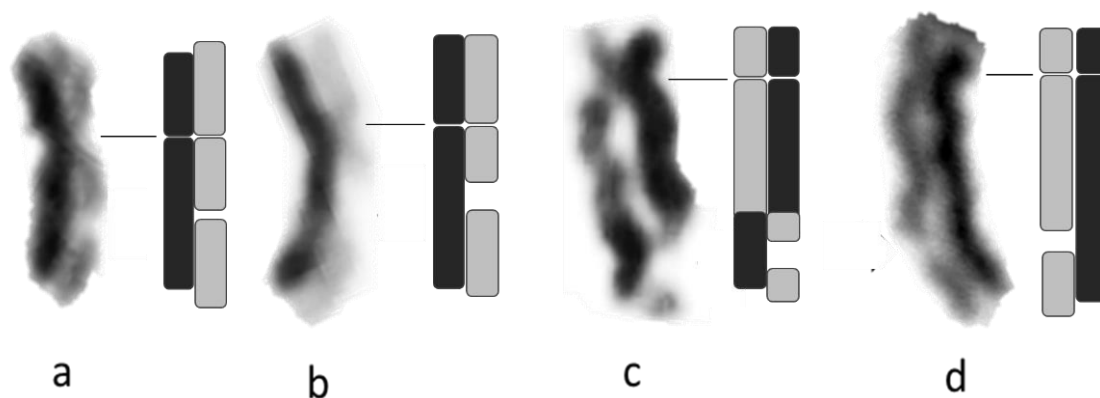


Figura 10. Metafases con presencia de roturas. a, b, c y d pertenecen a las metafases codificadas como Image0783 (A1), Image2449 (A7), Image0162(A13) y IMG_2742(A17) respectivamente.

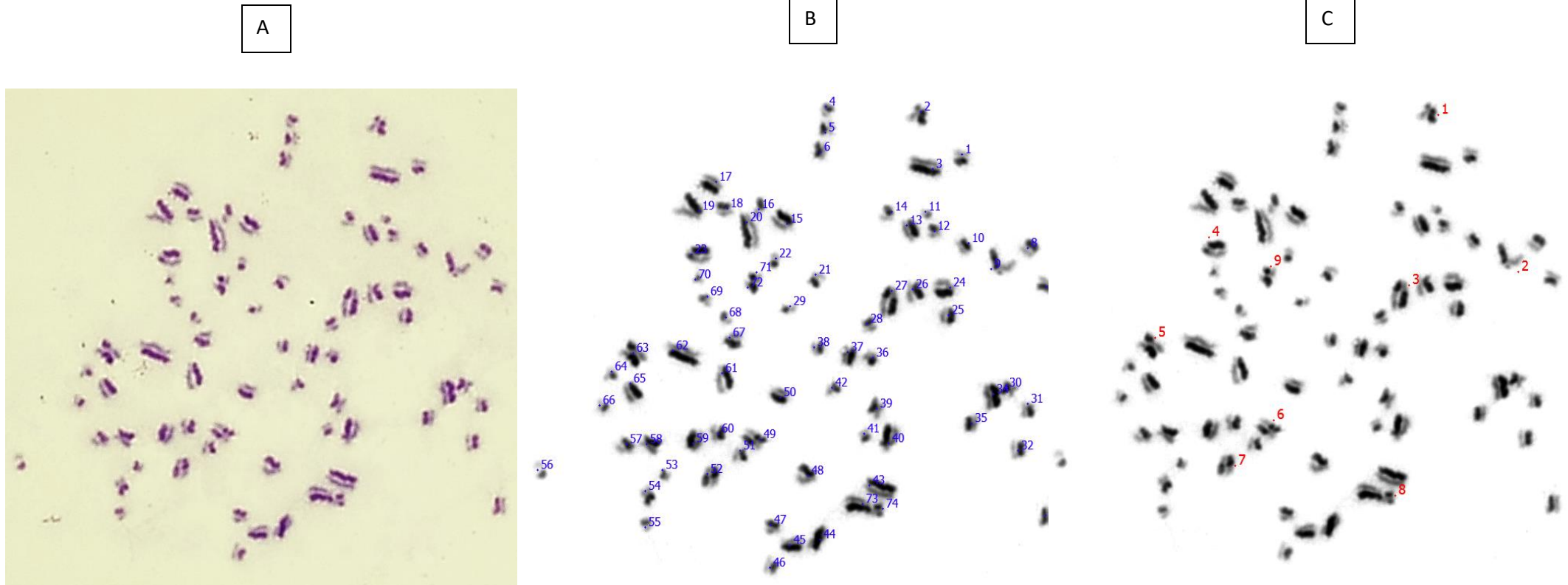


Figura 11. En A se puede apreciar la imagen original tomada sin filtros de luz, posteriormente se procesó con el programa Photoshop CC2015.5 a blanco y negro más un ajuste de contraste; en B se puede observar los conteos totales (en azul) y en C los conteos de SCE (en rojo).

De los 20 animales se obtuvieron 20 metafases con coloración diferencial para realizar el conteo de intercambio de cromátidas hermanas (SCE). Los resultados de la tabla 4 indican valores encontrados.

Metafasas	ANIMALES																			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8*	A9*	A10*	A11*	A13	A14*	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21
M1	5	6	5	8	13	9	8	9	12	12	8	16	13	11	8	11	7	9	7	8
M2	6	8	10	6	10	7	6	4	6	6	8	8	12	7	7	13	12	13	8	13
M3	8	6	5	7	11	11	6	13	9	7	8	5	7	11	14	10	11	12	9	9
M4	10	8	4	6	10	5	9	8	7	8	7	9	8	9	8	9	9	5	9	12
M5	6	9	9	6	10	7	10	9	12	8	5	6	8	13	10	7	14	8	8	9
M6	5	10	6	4	6	9	8	7	11	5	8	10	6	14	13	9	8	8	13	10
M7	8	9	7	5	6	6	6	8	8	8	7	6	10	10	14	9	4	13	9	7
M8	7	8	6	9	8	7	5	7	8	12	12	9	12	10	12	8	7	9	6	7
M9	8	9	9	8	11	7	7	11	10	10	9	5	9	7	11	9	8	9	7	11
M10	10	6	5	6	5	8	7	8	7	4	8	9	13	12	10	5	7	17	6	11
M11	8	5	8	7	8	8	7	12	11	7	6	13	9	7	9	8	8	10	10	5
M12	9	6	9	9	10	3	10	10	9	7	6	7	11	9	8	10	11	9	12	6
M13	9	6	10	10	8	9	10	8	8	10	9	14	8	6	11	11	6	9	11	10
M14	7	8	6	11	8	7	5	6	7	13	8	9	8	14	8	7	8	10	11	8
M15	7	9	6	5	4	6	5	6	8	7	8	9	7	9	13	10	8	8	8	13
M16	6	7	6	6	8	9	7	9	6	6	5	11	8	10	10	9	5	11	11	9
M17	9	9	8	6	5	9	6	7	6	6	7	13	12	6	11	13	7	13	10	13
M18	8	7	4	7	6	7	7	9	10	12	6	7	6	7	9	8	5	11	10	9
M19	12	10	9	7	6	10	7	10	8	7	7	14	8	11	8	8	7	9	13	8
M20	7	7	5	12	5	7	6	6	6	12	14	9	11	7	10	10	6	9	7	11
Suma	155	153	137	145	158	151	141	167	169	167	156	189	186	190	204	184	158	202	185	189
Promedio	7.75	7.65	6.85	7.25	7.9	7.55	7.05	8.35	8.45	8.35	7.8	9.45	9.3	9.5	10.2	9.2	7.9	10.1	9.25	9.45

Tabla 4. Conteo total de SCE en las alpacas de Huachocolpa. Los animales con un * sobre ellos son machos el resto son hembras.

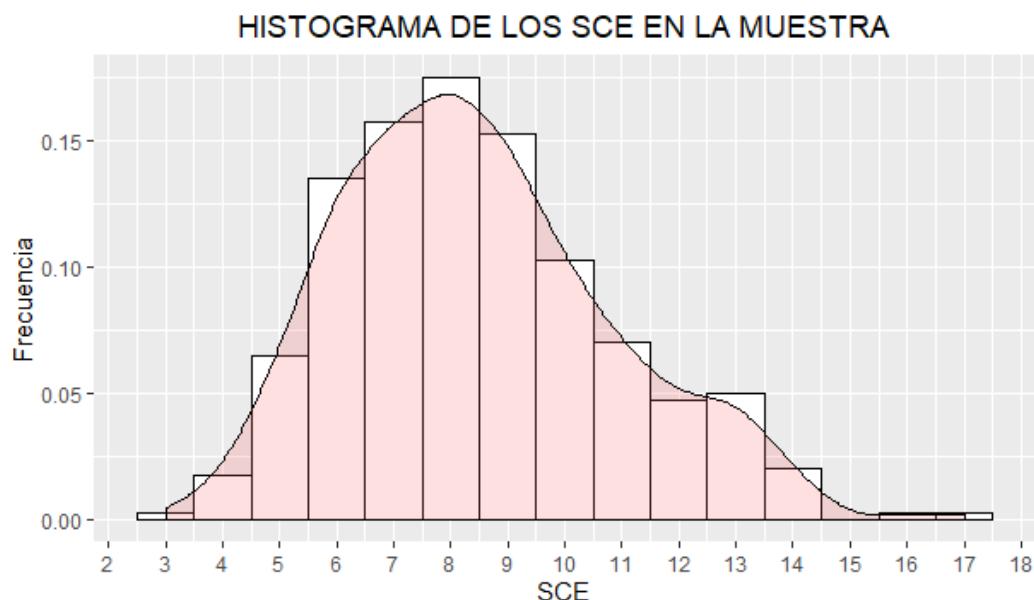


Figura 12. Frecuencias de SCE/célula en la muestra de Huachocolpa

Se realizó la búsqueda aleatoria de metafases en varias laminas preparadas de los cultivos de linfocitos procedente de cada animal, pero solo se reportaron 20 metafases con un número diploide de cromosomas ($2n=74$) las cuales fueron fotografiadas y analizadas con el programa Photoshop CC 2015.5, los conteos de cada metafase se ordenaron en la tabla 4. Solo el cultivo de la alpaca 12, al tener problemas en el crecimiento, no figura al no alcanzar el número de metafases requerido (7 metafases).

La media de los SCE de la población de Huachocolpa es de 8.37 SCE/ célula, una mediana de 8 SCE/célula y con una desviación estándar de 2.39, al realizar la prueba de normalidad de Shapiro – wilks se obtiene un estadístico W de 0.96 y un valor $P < 0.001$, lo cual afirma que nuestros datos no poseen una distribución normal, como también se puede observar en el histograma de los SCE/ célula en la figura 12.

La Figura 13 expone el “diagrama de cajas” donde se evidencia que las medias van desde 6 a 10 SCE, las muestras con poca dispersión pertenecen a los cultivos A6, A11 y A19; también se exhiben los conteos de SCE atípicos como en la muestra A19 donde el conteo de 5 y 17 intercambios los cuales se representan como puntos negros a los extremos de la caja. Al realizarse la Prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo un H de 72.59 y un valor $P < 0.0001$, lo cual indica que existe diferencias significativas entre las medianas de los animales. En la figura 14 se muestra la comparación entre las medias de SCE de cada alpaca las cuales indican que no existe diferencias significativas salvo entre algunas alpacas representadas con un asterisco.

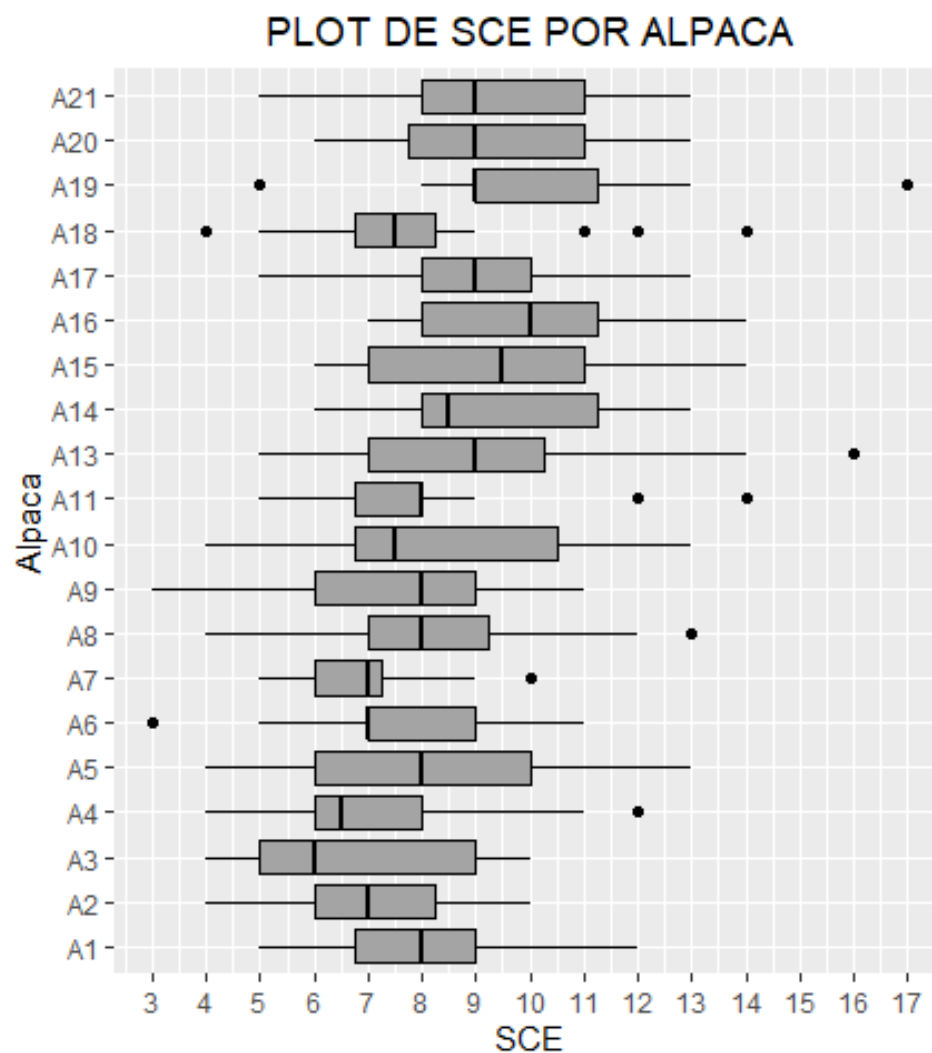


Figura 13. Box plot de los resultados obtenidos de los SCE por cada animal

COMPARACION DE LAS MEDIAS DE SCE ENTRE LOS CULTIVOS

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.48354

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2	sd																			
3	sd	sd																		
4	sd	sd	sd																	
5	sd	sd	sd	sd																
6	sd	sd	sd	sd	sd									*						
7	sd	sd	sd	sd	sd	sd					*			*	*		*	*		*
8	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd													
9	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd												
10	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd		*			*	*		*	*		*
11	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd										
12	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd									
13	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd								
14	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd							
15	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd						
16	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd					
17	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd				
18	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd			
19	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd		
20	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	

Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido

Figura 14. Prueba Tukey para comparación entre las medias de SCE, los números representan los 20 cultivos realizados en orden

Comparación de promedios de SCE entre machos y hembras

Sexo	SCE		
	Suma	Media	Desv. E
Machos	828	8.28	2.31
hembras	2492	8.31	2.35
No hay diferencia significativa, $p>0.05$			

Tabla 5. Comparación entre machos y hembras con el test de Mann-Whitney

La prueba de Mann-Whitney realizada para muestras no paramétricas arrojan un valor p de 0.6714, el cual indica que no existe diferencia significativa entre machos y hembras (Tabla 5). Sin embargo, al ser solo 5 alpacas machos se necesita mayor confirmación de su semejanza.

8.3. Puntuación de SCE en cada cromosoma observado

Se contabilizó un total de 29'600 cromosomas de las 20 metafases contadas con incorporación de BrdU, la contabilización de los cromosomas se distribuyó en las clases 0, 1, 2, 3 y 4 SCE (Figura 15), no se tuvo presencia de 5 SCE o más.

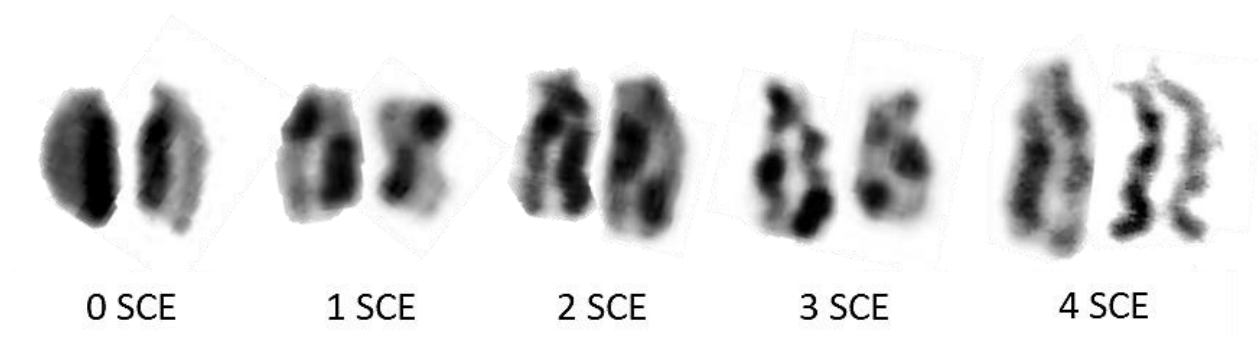


Figura 15. Cromosomas de alpaca obtenidos mediante la adición de BrdU clasificados según el número de SCE que poseen cada uno. Sin SCE (clase 0), 1 SCE (clases 1), 2 SCE (clases 2), 3 SCE (clase 3) y 4 SCE (clase 4).

La clase 0 SCE incluyó 26'441 cromosomas, las otras clases mostraron 3'357 eventos de SCE distribuidos en 3'159 cromosomas (tabla 6). El valor medio de SCE/cromosomas con incorporación de BrdU fue de 0.113 y las frecuencias esperadas derivadas de la distribución de Poisson fueron 0.8927, 0.1012, 0.0057 y 0.0002 (con valores absolutos de 26426.36, 2997.07, 169.9 y 6.4) para las clases 0, 1, 2, 3 y 4 SCE respectivamente, se realizó el mismo análisis para machos y hembras (Tabla 7). La comparación entre los valores observados de la clasificación de SCE entre hembras y

machos, permite verificar si existen diferencias en la incidencia de SCE entre ambos sexos, se realizó una prueba Chi cuadrado donde se obtiene $X^2 = 1.37$ y P value = 0.71.

Alpaca	CANTIDAD DE SCE EN CADA CROMOSOMA					
	0	1	2	3	4	> 4
A1	1333	137	9	1	0	0
A2	1346	124	9	1	0	0
A3	1348	127	5	0	0	0
A4	1351	122	6	1	0	0
A5	1328	146	6	0	0	0
A6	1341	129	8	2	0	0
A7	1343	133	4	0	0	0
A8	1319	154	7	0	0	0
A9	1331	144	5	0	0	0
A10	1321	152	6	1	0	0
A11	1337	133	8	2	0	0
A13	1309	158	12	0	1	0
A14	1306	163	11	0	0	0
A15	1297	174	9	0	0	0
A16	1286	183	11	0	0	0
A17	1306	162	12	0	0	0
A18	1330	141	8	0	1	0
A19	1287	185	8	0	0	0
A20	1315	148	15	1	1	0
A21	1307	161	12	0	0	0
Total	26441	2976	171	9	3	0

Tabla 6. **Cantidad de SCE en cada cromosoma.** Se muestra la clasificación de cromosomas según el número de SCE que posee

Comparación entre machos y hembras

Género		CANTIDAD DE SCE EN CADA CROMOSOMA					Distr. Poisson		
		0	1	2	3	4	χ^2	GL	P
Total	Obs.	26441	2976	171	9	3	0.51	3	0.91
	Esp.	26426.36	2997.07	169.95	6.42	0			
hembras	Obs.	19827	2230	134	6	3	0.39	3	0.94
	Esp.	19949.42	2132.43	113.96	4.06	0			
Machos	Obs.	6614	746	37	3	0	0.74	NA	0.87
	Esp.	6654.30	706.79	37.53	1.32	0			

Tabla 7. Cantidad de cromosomas observada y esperada según las clases de SCE. En machos se realizó una prueba de Chi-cuadrado de Pearson con valor p simulado al contener un valor menor a 5.

8.4. Ubicación de los SCE en cada cromosoma observado

Al realizarse el conteo según la ubicación de SCE en cada cromosoma se obtuvo la tabla 8, donde se ordenan los promedios de los conteos de SCE por animal. Claramente se puede apreciar que el brazo q posee mayor cantidad de SCE (93.7%), seguido del brazo p (6.1%). En función a cercanía a la región centromérica los SCE intersticiales representan el 49.7% del total, los SCE terminales el 32.8% y los SCE proximales el 17.5% (figura 7). Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro – Wilks para cada ubicación, y solo los SCE en el brazo q no presentaron una distribución normal (Figura 09). Se realizó una prueba Chi cuadrado entre machos y hembras respecto a las ubicaciones de los SCE en los cromosomas, obteniéndose que no hay diferencia significativa entre ambos sexos (Tabla 10). En la Figura 16 se puede observar la esquematización de la distribución de los

intercambios en cada cromosoma observado, en rojo se muestra la ubicación en la extensión del cromosoma y en azul la cercanía al centrómero.

Alpaca	Intersticial	Terminal	Proximal	Brazo p	Brazo q
A1	4.05	2.45	1.3	0.65	5.85
A2	4.15	1.6	1.45	0.45	5.3
A3	3.45	2.85	0.6	0.45	5.85
A4	3.95	2.05	1.3	0.2	5.65
A5	3.35	2.6	1.7	0.65	5.45
A6	3.7	2.25	1.6	0.4	5.55
A7	3.5	2.35	1.4	0.35	5.5
A8	4.5	2.4	1.55	0.3	6.6
A9	3.55	2.7	1.45	0.35	5.9
A10	4.1	2.85	1.45	0.55	6.4
A11	3.95	2.35	1.35	0.45	5.85
A13	4.45	3.05	1.8	0.5	7
A14	3.85	3.75	1.65	0.45	7.15
A15	4.3	3.65	1.55	0.5	7.45
A16	4.9	3.65	1.65	0.65	7.9
A17	4.75	2.95	1.55	0.45	7.25
A18	3.8	2.95	1.25	0.45	6.3
A19	4.8	3.45	1.95	0.15	8.05
A20	4.9	2.7	1.55	0.25	7.35
A21	5.55	2.55	1.25	0.25	7.85
Promedio	4.1775	2.7575	1.4675	0.4225	6.51

Tabla 8. Promedio de SCE por su ubicación en el cromosoma.

Ubicación	N	Media	D.E.	W	Valor P	%	
Intersticial	20	4.18	0.59	0.94	0.45	49.7	100
Terminal	20	2.76	0.56	0.95	0.59	32.8	
Proximal	20	1.47	0.27	0.91	0.18	17.5	
p	20	0.42	0.14	0.92	0.26	6.1	100
q	20	6.51	0.91	0.87	0.03	93.9	

Tabla 9. Prueba de Shapiro – Wilks en cada ubicación.

Alpaca	Intersticial	Terminal	Proximal	Brazo p	Brazo q	χ^2	P-value
Machos	3.99	2.81	1.49	0.42	6.38	0.008	1
Hembras	4.24	2.74	1.46	0.42	6.55		

Tabla 10. Ubicación de SCE según sexo

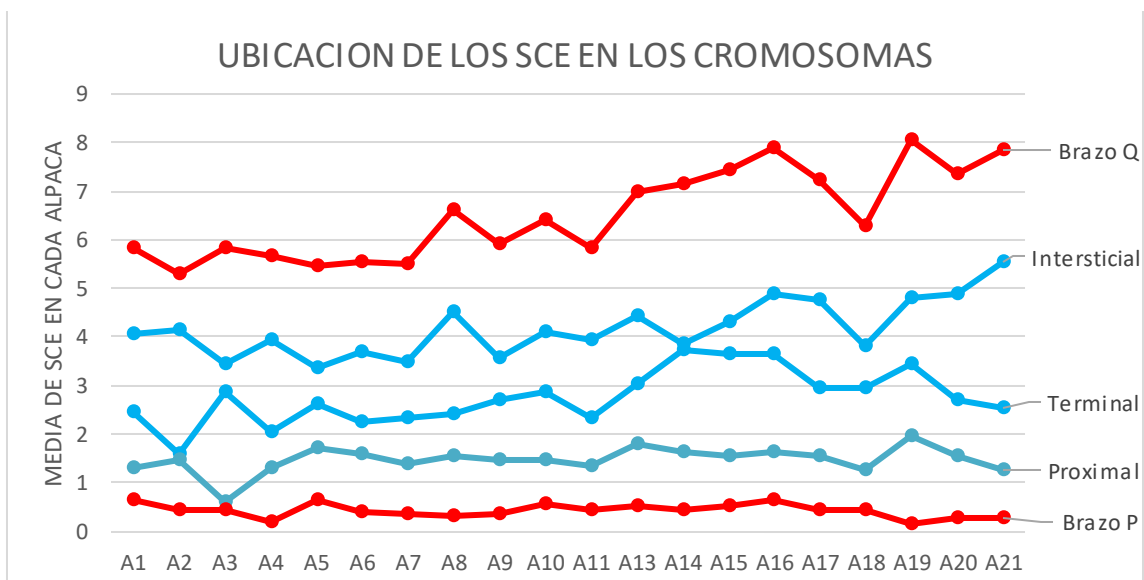


Figura 16. Ubicaciones de los SCE en los cromosomas.

9. DISCUSIÓN

El test de Intercambio de cromátidas hermanas permite evaluar la influencia de factores físicos y químicos potencialmente mutagénicos, genotóxicos y, en última instancia, incluso cancerígenos en el organismo animal (Sunada *et al.*, 2019). El resultado de la prueba aquí efectuada permite descartar diversos mutágenos, además de ayudar a predecir posibles consecuencias genéticas en las células animales o evaluar la resistencia animal frente a contaminantes (Hema *et al.*, 2011). También es útil para verificar la influencia de los contaminantes frente a variables tales como sexo, edad, raza o procedencia.

Como generalmente ocurre al utilizar la prueba SCE, la incorporación de BrdU logra una diferenciación nítida de color entre ambas cromátidas hermanas que apreciamos en nuestros resultados, siempre cuidando la concentración apropiada para no modificar el número de SCE espontáneos (Murali y Panneerselvam, 2011), lo cual lo hace perfectamente comparable con otros estudios. La incorporación de BrdU al ADN produce también la asimetría longitudinal observada entre las cromátidas hermanas (Figura 9), la cual es más evidente en cromosomas sin SCE (Raposo *et al.*, 2004). Otro evento observado durante este estudio es la presencia de aberraciones cromosómicas (AC) del tipo rotura de cromátida, la cual hemos evidenciado solo en la cromátida dibromosustituída, suceso que cuenta con antecedente de estar razonablemente relacionado a los SCE (Ray, 1996; Mühlmann-Díaz y Bedford 1995; Çelik y Akbas, 2005).

Usualmente en la ubicación de los SCE se los considera: SCE proximales, intersticiales o terminales, ya que los SCE suelen aparecer mayormente en lugares de unión entre eucromatina y heterocromatina (Kuchta-Gładysz *et al.*, 2015), además de la región terminal que sería especialmente vulnerable al daño causado por estrés oxidativo según Kawanishi y Oikawa (2004). Hemos encontrado que la mayoría de los intercambios están representados por los SCE intersticiales (49.7%), seguidos de los SCE terminales (32.8%) y por último los SCE proximales (17.5%), esto se corrobora con otros resultados (Wójcik *et al.*, 2011; Kuchta-Gładysz *et al.*, 2016)

en los cuales los SCE intersticiales son más numerosos, aunque algunos otros estudios reportan la mayoría en los SCE terminales (Grzesiakowska *et al.*, 2017), esto podría deberse a algún tipo de secuencia especial de la zona cromosómica (¿rica en timina?). No se encontraron diferencias significativas en la ubicación de los SCE entre alpacas machos y hembras ($P > 0.05$). Observaciones similares se reportaron en caballos (Wójcik *et al.*, 2011) y cabras (Wójcik y Smalec, 2012).

De acuerdo a lo obtenido sobre los tipos de SCE se observaron 29'600 cromosomas de los cuales 26441 tenían cero SCE, 2976 con un SCE, 171 con dos SCE, 9 con tres SCE y 3 con cuatro SCE. Estos índices responden a la distribución de Poisson (tabla 7), tanto el total de la muestra como los grupos separados por sexo, este tipo de distribución ha sido encontrada en distintas especies animales y vegetales (Carrano y Wolff, 1975; Raposo *et al.*, 2004) es decir que son eventos independientes y completamente aleatorios, limitados tal vez por la longitud del cromosomas (Latt 1974a; Kato 1977), como se ve en la tabla 8 los SCE en el brazo q superan a los ubicados en el brazo p (Figura 16), ya que el cariotipo de alpacas posee una gran mayoría de cromosomas subtelocéntricos y submetacéntricos (Espinoza *et al.*, 2008; Ramos, 2014). Por otro lado, las pruebas de comparación de medianas (prueba de Kruskal-Wallis) y la comparación entre medias (Figura 14) indican que existen algunas diferencias significativas entre las mismas alpacas, pese a que la respuesta entre machos y hembras no posee diferencia significativa en los conteos totales ni en los tipos de SCE. Tales diferencias entre los individuos podrían deberse a la respuesta propia de cada animal frente, por ejemplo, a la contaminación, a su estado metabólico y/o ciclo reproductivo como ya ha sugerido Regoli *et al.* (2005).

La frecuencia media observada en nuestra muestra de alpacas adultas fue de 8.37 ± 2.39 SCE/célula. Haciendo un esfuerzo comparativo vemos que las magnitudes de los valores obtenidos son notablemente más elevadas a los resultados encontrados previamente en unos de sus parientes más cercanos por Mahmoud *et al.*, (2005) los que trabajaron con camellos (*Camellus dromedarius*) adultos y jóvenes, obteniendo los valores de 5.17 ± 0.51 y 2.89 ± 0.47 SCE/célula respectivamente.

Estos autores los consideraron significativamente diferentes cuando los compararon según su edad, y asumiendo que la diferencia entre jóvenes y adultos es semejante a la diferencia encontrada entre los adultos de nuestro estudio y los de Mahmoud *et al.*, (2005), se podría considerar que nuestros resultados muestran un incremento que se podría clasificar de significativo frente a su pariente, el cual podría tomarse como un valor referente de una población no afectada. Adicionalmente, Ghazi *et al.* (2008) reportaron otra media de 3.21 ± 0.45 SCE/célula también en camellos adultos, sin embargo, al solo haber utilizado a 5 individuos no sería propio considerarlo para una comparación válida. Otros estudios en animales de granja, informan de frecuencias medias de 5.07 ± 2.41 SCE/célula en ganado bovino (Ciotola *et al.*, 2005), 6.32 ± 2.9 SCE/ célula informado en cerdos (Peretti *et al.*, 2006) y 5.14 ± 1.44 SCE/ célula en caballos (Wójcik *et al.*, 2011), todos estos estudios a una concentración de 10 ug/ml para el BrdU, el cual es usado como dosis global al menos para animales de granja (Di Berardino *et al.*, 1995; Nicolae *et al.*, 2009;), estos índices refuerzan la idea una media SCE más o menos constante en otros animales de granja, aun considerando la diferencia en el número cromosómico.

Nuestros datos indican que existe un aumento de los SCE en referencias a especies cercanas a la alpaca (camellos) no afectadas, este hecho sigue la línea de evidencias encontradas en otros animales, como la presencia de metales pesados en la alimentación en ovejas, que incrementaron la frecuencia de intercambios de 7.86 a 9.28 SCE/célula (Siviková y Dianovsky, 1995), o el incremento de 8.3 a 11.8 SCE/célula en búfalos por cercanía a zonas contaminadas por gases industriales y polución automotriz (Ahmed *et al.*, 1998). Estudios actuales refuerzan el hecho que en diversas especies los grupos experimentales o afectados exhiben frecuencias medias de SCE significativamente más elevadas en comparación a los controles o no afectados, lo que indica un efecto genotóxico en los cromosomas del ganado, producto de la contaminación (Murali, 2007; Murali y Panneerselvam 2011).

El efecto de la contaminación puede observarse a corto o largo plazo, pero una exposición constante y elevada del mutágeno tiende a incrementar los SCE (Murthy, 1979), estos mutágenos pueden atacar directamente a los animales objetivo o entrar en la cadena alimenticia de la zona y terminar en los consumidores de pastos contaminados (Gulson *et al.*, 1996), o pasar a consumidores primarios a través de la carne o leche de los animales contaminados, en su mayoría por presencia de metales pesados en el agua, pastos o forrajes (Reyes *et al.*, 2016), para ello es necesario promover más investigaciones que revelen los límites máximos permisibles de concentración de metales o gases derivados de actividades humanas, sean mineras o de cualquier otra industria (Fahmy, 2000; Carere *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2006; Puga *et al.*, 2006; Tapisso *et al.*, 2009). Nuestros datos obligan al estudio de otras poblaciones de alpacas alejadas de zonas mineras, para conocer los valores base de SCE de referencia en esta especie y confirmar si el número de SCE que reportamos son realmente elevados.

La alpaca, como vimos en el presente estudio, podría ser sensible a la polución proveniente de la cercanía a las mineras, esto es evidenciado por la relativa alta frecuencia de SCE encontrados en nuestra muestra, lo cual nos daría a considerar preliminarmente la presencia de un daño genotóxico, mutagénico y/o carcinogénico producido por los efectos de poluentes derivados de minería. Adicionalmente, Squadrone *et al.* (2018) reportaron la capacidad bioacumuladora de alpacas ocasionado por el consumo de forraje contaminado, encontrando altos niveles de metales pesados en su fibra, de entre ellos, Al, Zn y Cu. Huanqui (2018), por su parte, también reporta en alpacas cercanas a mineras en Puno presencia de metales pesados en carne, huesos y fibra.

Si la distribución de alpacas en el Perú (INEI, 2012) (figura 2) muchas veces coincide con las zonas de concesiones mineras (DGE CIA-DIIA, 2018) (Figura 3), podríamos afirmar que la presencia de rebaños de alpaca comparte frecuentemente localidades geográficas con la minería activa en zonas altoandinas. Siguiendo lo planteado por Saldiva y Böhm (1998), la alpaca posee la sensibilidad genotóxica y la capacidad bioacumuladora necesarias para considerar primariamente el potencial de esta especie para convertirse en un individuo centinela, los cuales pueden servir para monitorear zonas contaminadas por diversas actividades antropogénicas. De ser el caso el monitoreo podría realizarse antes, durante y después de cualquier actividad humana que provoque consecuencias ambientales desfavorables en zonas geográficas cercanas (Poletta *et al.*, 2008).

10. CONCLUSIONES

- Los resultados indican que la media de intercambios de cromátidas hermanas de sangre periférica en las alpacas de Huachocolpa - Huancavelica es de 8.37 ± 2.39 SCE/célula.
- La media de SCE encontrada en el presente estudio es superior a las reportadas en uno de sus parientes más cercanos: el camello (5.17 ± 0.51 SCE/célula). Al ser la cercanía a la minera, la única variable que pueda alterar los SCE, se podría asumir que es fuente del incremento de los SCE aquí detectados en nuestra muestra. Este planteamiento confirma la hipótesis nula planteada para este estudio.
- La frecuencia de eventos de SCE por cromosoma exhibe la distribución de Poisson. Esto apoya el planteamiento de que los eventos de SCE son aleatorios e independientes como afirma la literatura preexistente.
- Las ubicaciones de los SCE en los cromosomas de linfocitos de sangre periférica están asociados a la longitud del brazo de los cromosomas, al estar en su mayoría presente en el brazo largo.
- No existe diferencia significativa entre machos y hembras en la relación al conteo total de SCE, en la puntuación de los eventos de SCE por cromosoma y en la ubicación de SCE en cada cromosoma.
- Finalmente podemos concluir que hemos cumplido los objetivos planteados por este trabajo

RECOMENDACIONES

- Incrementar el número de metafases analizadas y el número de animales para obtener un mejor apoyo estadístico.
- Realizar el estudio de SCE en alpacas ambientalmente óptimas, en diferentes zonas del país para obtener una línea base de SCE para futuros estudios.
- Coordinar con universidades o instituciones gubernamentales que posean centros de crianza de alpacas para una mejor accesibilidad a los rebaños.
- Realizar más estudios de genotoxicidad en alpacas con la finalidad de postular a estos animales como individuos centinelas para monitorear las zonas contaminadas altoandinas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S., Mahrous, K., and El-Sobhy, H. (1998). Cytogenetic study of buffalo under pollution of environmental conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 419(1-3), 21-26.
- Alfaro, S. (2006). Producción de Alpacas Alternativa Rentable Para las Familias Alto Andinas de la Zona Centro de Ayacucho. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 10, 73.
- Alvarez Gonçalvez, C. V., Arellano, F. E., y Pérez C., A. L. (2015). Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal. SNA: Publicación periódica científico. 7ma edicion. Argentina.
- Arnaudeau, C., Lundin, C., and Helleday, T. (2001). DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *Journal of molecular biology*, 307(5), 1235-1245.
- Barreto, T., Alfonso, Y., Lafaye, P., García Lazaro, M. D. P., Agueda Perez, L., Herrera-Velit, P., y Espinoza, J. R. (2018). Anticuerpos de cadena única de alpaca para la detección de antígenos de *Fasciola hepatica*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35, 573-580.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T. and Schøyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Marine environmental research*, 130, 338-365.
- Brack, A. (2000). Perú biodiversidad y biocomercio, situación actual y potencial. Comité Biocomercio Perú, 81.
- Bunch, T. D., Foote, W. C., and Maciulis, A. (1985). Chromosome banding pattern homologies and NORs for the Bactrian camel, guanaco, and llama. *Journal of Heredity*, 76(2), 115-118.
- Campos C., L. A. (2018). El desarrollo de la minería en la sociedad colonial: La Plata y Potosi (1580 - 1630).
- Cardoso, R. S., Takahashi-Hyodo, S., Peitl Jr, P., Ghilardi-Neto, T., and Sakamoto-Hojo, E. T. (2001). Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 21(6), 431-439.

- Carere, A., Andreoli, C., Galati, R., Leopardi, P., Marcon, F., Rosati, M. V., ... and Crebelli, R. (2002). Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2), 215-224.
- Carrano, A. V., and Wolff, S. (1975). Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac. *Chromosoma*, 53(4), 361-369.
- Çelik, A., and Akbaş, E. (2005). Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1), 106-112.
- Chandrasekaran, R., Samy, P. L. P., and Murthy, P. B. K. (1996). Increased sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from traffic policemen exposed to automobile exhaust pollution. *Human and experimental toxicology*, 15(4), 301-304.
- Ciotola, F., Peretti, V., Meo, G. P. D., Perucatti, A., Iannuzzi, L., and Barbieri, V. (2005). Sister chromatid exchanges (SCE) in the Agerolese cattle population. *Veterinary research communications*, 29, 359-361.
- Çok, İ., Ulutas, O. K., Okusluk, Ö., Durmaz, E., and Demir, N. (2011). Evaluation of DNA damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by comet assay for determination of possible pollution in Lake Mogan (Ankara). *The Scientific World Journal*, 11, 1455-1461.
- Conrad, S., Kunzel, J., and Löbrich, M. (2011). Sister chromatid exchanges occur in G2-irradiated cells. *Cell Cycle*, 10(2), 222-228.
- Coria, I. D. (2008). El estudio de impacto ambiental: características y metodologías. *Invenio*, 11(20), 125-135.
- De La Torre, N. S., Calle, R. L. L., y Vásquez, B. (2014). Diseño tecnológico del procesamiento de salchichas de alpaca de alto contenido proteico. *Industrial Data*, 17(2), 105-111.
- De Los Ríos, E. (2006). Producción textil de fibras de camélidos sudamericanos en el área alto-andina de Bolivia, Ecuador y Perú. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (UNIDO). Disponible en: <https://www.unido.org/file-storage/download>.

- DECRETO SUPREMO N° 015-2012-AG (2012). Reglamento Sanitario del Faenado de Animales de Abasto (publicado el 10/11/2012). Diario Oficial El Peruano.
- Del Pozo L. C. y Paucarmayta T. V. (2015). Impacto de la minería en la producción agropecuaria en el Perú, impactos heterogéneos y determinación de los canales de transmisión. Centro Bartolomé de las Casas. Cusco – Perú.
- Dellavedova, M. (2011). Guía metodológica para la elaboración de una evaluación de impacto ambiental. Tallervertical Meda altamirano yantorno. La Plata.
- Descailleaux D., J. R. (2018). Los cariotipos de las llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Vicugna pacos*) de Junín y Huancavelica muestran al menos dos mutaciones estructurales.
- DGE CIA-DIIA (2018). Mapa de Concesiones Mineras. Mapa Temático. 1:6,032,526. Instituto Geológico Minero y Metalúrgico – INGEMMET. WGS84.
- Di Berardino, D., Lioi, M. B., Scarfi, M. R., Jovino, V., and Marigliano, P. (1995). Spontaneous sister chromatid exchanges in mitotic chromosomes of cattle (*Bos taurus* L). Genetics Selection Evolution, 27(5), 385.
- Espinoza, G. (2001). Fundamentos de evaluación de impacto ambiental. Banco Interamericano De Desarrollo–Bid. Centro De Estudios Para El Desarrollo–Ced Santiago–Chile.
- Espinoza, M., Oliveros, N., y Arias, N. (2008). Descripción de la estructura cromosómica de los camélidos sudamericanos.
- Fahmy, M. A. (2000). Potential genotoxicity in copper sulphate treated mice. Cytologia, 65(3), 235-242.
- Fernández S., A. G., Gutiérrez R., G. A., y Ponce de León B., F. A. (2019). Identificación bioinformática de Polimorfismos de Nucleótido Simple (PNSs) en genes candidatos para las características de la fibra en alpacas (*Vicugna pacos*). Revista peruana de biología, 26(1), 87-94.
- Fernández, B S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

- Florez Estrada, F. E. (2016). Caracterización de marcadores genéticos en genes que codifican a proteínas asociadas a queratina y evaluación de la asociación del gen KRTAP11-1 al diámetro de fibra en alpaca (*Vicugna pacos*) siguiendo una aproximación de gen candidato.
- Ghazi, Y. A., Farghaly, A. A., Karima, G., Mahmoud, M., and Ghazy, A. A. (2008). Preliminary Studies on Chromosomal Abnormalities and Sister Chromatid Exchanges Associated with Trypanosomosis in Relation to Male Camel Fertility. *Asian J. Anim. Vet. Adv*, 3, 254-262.
- Grzesiakowska, A., Klott, A., Kuchta-Gładysz, M., Niedbała, P., Otwinowska-Mindur, A., and Szeleszczuk, O. (2017). Evaluation of BrdU Influence on Sister Chromatid Exchange in Arctic and Silver Fox. *Folia Biologica*, 65(2), 117-126.
- Gulson, B. L., Mizon, K. J., Korsch, M. J., and Howarth, D. (1996). Non-orebody sources are significant contributors to blood lead of some children with low to moderate lead exposure in a major lead mining community. *Science of The Total Environment*, 181(3), 223-230.
- Gulson, B. L., Mizon, K. J., Korsch, M. J., and Howarth, D. (1996). Non-orebody sources are significant contributors to blood lead of some children with low to moderate lead exposure in a major lead mining community. *Science of The Total Environment*, 181(3), 223-230.
- Hema, L., Murali, N., Devendran, P., and Panneerselvam, S. (2011). Genotoxic Effect of Dye Effluents in Chromosomes of Indigenous Goats (*Capra hircus*). *Cytologia*, 76(3), 269-277.
- Herrera, P., y Millones, O. (2011). ¿Cuál es el costo de la contaminación ambiental minera sobre los recursos hídricos en el Perú? Consorcio de Investigación Económica y Social (CIES). Pontifica Universidad Católica del Perú. Departamento de Economía.
- Honma, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Tanabe, H., Sugimoto, M., Furuichi, Y., ... and Hayashi, M. (2002). Chromosomal instability in B-lymphoblastoid cell lines from Werner and Bloom syndrome patients. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 520(1-2), 15-24.
- Huanca, T., Apaza, N., y Gonzáles, M. (2007). Experiencia del INIA en el fortalecimiento del banco de germoplasma de camélidos domésticos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 15(Supl 1), 186-194.
- Huanqui Pérez, R. (2018). Determinación de metales pesados en pastos, fibra, carne y vísceras de alpacas en comunidades del distrito de Ananea-Puno. Universidad Nacional del Altiplano.

- Iannuzzi, L., and Di Berardino, D. (2008). Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal cytogenetics. *Journal of applied genetics*, 49(4), 357-366.
- Ikbal, M., Atasoy, M., Pirim, I., Aliagaoglu, C., Karatay, S., and Erdem, T. (2006). The alteration of sister chromatid exchange frequencies in Behcet's disease with and without HLA-B51. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 20(2), 149–152.
- INEI (2012). IV censo nacional Agropecuario 2012. Instituto nacional de estadística e informática.
- Ishii, Y., and Bender, M. A. (1978). Factors influencing the frequency of mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine-substituted human lymphocytes in culture. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 51(3), 411-418.
- Jiménez, C. E. P., Espada, C. M., and Vázquez, M. D. C. (2010). Camélidos sudamericanos: clasificación, origen y características/south american camelids: classification, origen and characteristics. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 4(1), 23.
- Kadwell, M., Fernandez, M., Stanley, H. F., Baldi, R., Wheeler, J. C., Rosadio, R., and Bruford, M. W. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1485), 2575-2584.
- Kamranvar, S. A., and Masucci, M. G. (2011). The Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress. *Leukemia*, 25(6), 1017.
- Kato, H. (1977). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labeling method. In *International Review of Cytology* (Vol. 49, pp. 55-97). Academic Press.
- Kawanishi, S., and Oikawa, S. (2004). Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019(1), 278-284.
- Korenberg, J. R., and Freedlender, E. F. (1974). Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, 48(4), 355-360.
- Kuchta-Gładysz, M., Wójcik, E., Szeleszczuk, O., Niedbała, P., and Wojnar, T. (2016). The effect of bromodeoxyuridine on spontaneous sister chromatid exchange frequency in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and coypu (*Myocastor coypu*) chromosomes. *Folia biologica*, 64(2), 89-96.

- Kuchta-Gładysz, M., Wójcik, E., Szeleszczuk, O., Niedbała, P., and Tyblewska, K. (2015). Spontaneous sister chromatid exchange in mitotic chromosomes of the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Canadian journal of animal science*, 95(4), 543-550.
- Latt, S. A. (1974a). Localization of Sister Chromatid Exchanges in Human Chromosomes. *Science*, 185(4145), 74–76. doi:10.1126/science.185.4145.74
- Latt, S. A. (1974b). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(8), 3162-3166.
- Latt, S. A. (1981). Sister chromatid exchange formation. *Annual review of genetics*, 15(1), 11-53.
- Lazutka, I., and Dedonite, V. V. (1990). A decrease in sister chromatid exchange frequency during the prolonged cultivation of human lymphocytes. *Tsitologiia*, 32(12), 1193-1197.
- Liou, S. H., Jacobson-Kram, D., Poirier, M. C., Nguyen, D., Strickland, P. T., and Tockman, M. S. (1989). Biological monitoring of fire fighters: sister chromatid exchange and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral blood cells. *Cancer research*, 49(17), 4929-4935.
- Mahmoud, K. G. M., and Farghaly, A. (2005). Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and nuclear status of immature oocytes in relation to age of dromedary camels. *Cytologia*, 70(3), 295-301.
- Mamani M., C. V. (2018). Mapa físico de polimorfismos de nucleótido simple en Alpaca (*Vicugna pacos*) usando un panel de células híbridas irradiadas Alpaca/Hámster.
- Marin, J. C., Zapata, B., Gonzalez, B. A., Bonacic, C., Wheeler, J. C., Casey, C., ... y Spotorno, Á. E. (2007). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista chilena de historia natural*, 80(2), 121-140.
- Martinez F. Z. (2018). “Estudio de la calidad de fibra de camelidos domesticos llama (lama glama) alpaca (*Vicugna pacos*) y del hibrido Misti”. Asesor: Celso Ayala Vargas. Tesis de Maestria. La Paz – Bolivia.
- Mengoni G., G. L. (2008). Camelids in ancient Andean societies: A review of the zooarchaeological evidence. *Quaternary International*, 185(1), 59-68.

- Miller, R. C., Aronson, M. M., and Nichols, W. W. (1976). Effects of treatment on differential staining of BrdU labeled metaphase chromosomes: three-way differentiation of M 3 chromosomes. *Chromosoma*, 55(1), 1-11.
- MINAGRI, (2018). Anuario Estadístico “Producción Pecuaria y Avícola 2018”. Ministerio de Agricultura y Riego.
- MINEM (2018). Anuario Minero 2017 (pág. 38). M. d. Minas, Anuario.
- Morante, R., Goyache, F., Burgos, A., Cervantes, I., Pérez-Cabal, M. A., and Gutiérrez, J. P. (2009). Genetic improvement for alpaca fibre production in the Peruvian Altiplano: the Pacamarca experience. *Animal Genetic Resources/Recursos génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 45, 37-43.
- Moreyra M., J. C. (2018) Sumaq alpaca situación de la alpaca en el Perú. Boletín situación de la alpaca en el Perú. Dirección General de Políticas Agrarias / Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria. Ministerio de Agricultura y Riego - MINAGRI Dirección General de Políticas Agrarias.
- Mühlmann-Díaz, M. C., and Bedford, J. S. (1995). Comparison of gamma-ray-induced chromosome ring and inversion frequencies. *Radiation research*, 143(2), 175-180.
- Murali, N. (2007). Genotoxic effect of tannery pollution in crossbred cattle. *Indian J Anim Sci*, 78, 702-705.
- Murali, N., and Panneerselvam, S. (2011). Effect of concentration of bromodeoxyuridine on sister chromatid exchange frequency in crossbred (*Bos taurus* x *Bos indicus*) cattle chromosomes. *Tamilnadu J. Vet. Anim. Sci*, 7, 71-78.
- Murthy, P. B. K. (1979). Frequency of sister chromatid exchanges in cigarette smokers. *Human genetics*, 52(3), 343-345.
- Nevstad, N. P. (1978). Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced in human lymphocytes by the cytostatic drug adriamycin in vivo and in vitro. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 57(2), 253–258.
- Nicolae, I., Enculescu, M., Vidmichi, D., Paraschivescu, M., Bota, A., and Hârceagă, L. (2009). Sister chromatid exchanges in river buffalo females with chromosomal fragility. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 42(1), 64-69.

- Nolasco, S. (2011). Impactos de la minería metálica en Centroamérica. Centro de investigaciones sobre inversión y comercio (CEICOM). Conflictos mineros.
- Nolasco, S. (2011). Impactos de la minería metálica en Centroamérica. Centro de investigaciones sobre inversión y comercio (CEICOM). Conflictos mineros.
- Oria, I., Quicaño, I., Quispe, E., y Alfonso, L. (2009). Variabilidad del color de la fibra de alpaca en la zona altoandina de Huancavelica-Perú. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 45, 79-84.
- Oyagüe M., J., Salvá Ruiz, B. K., Ramos D., D., Arenas C., R., Caro C., I., Diez F., A., Castro M., A., Fernandez G., D., Moreno I., C., Romero A., M. A. y Encina Z., C. (2011). Manual de elaboración de diversos productos cárnicos de alpaca apropiados para la zona andina [Perú]. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú.
- Painter, R. B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 70(3), 337-341.
- Paiva, L., Martínez, V., Creus, A., Quinteros, D., and Marcos, R. (2006). Sister chromatid exchange analysis in smelting plant workers exposed to arsenic. *Environmental and molecular mutagenesis*, 47(4), 230-235.
- Palomino, S., Edraki, M., Unger, C., Condorhuaman, A., Chumbe, M., García, F., and Moreno, J. L. (2016). Environmental Quality Assessment of Potentially Toxic Elements in Surface Water in Palca Abandoned Mine, Puno Region, Peru.
- Peretti, V., Ciotola, F., Dario, C., Albarella, S., Pia, D. M., Perucatti, A. and Iannuzzi, L. (2006). Sister chromatid exchange (SCE) for the first time in Casertana pig breed. *Hereditas*, 143(2006), 113-116.
- Perez C., J. D. (1999). Minería del cobre y contaminación atmosférica. Estrategias empresariales en las cuencas de Swansea, Huelva y Montana. *Revista de Historia Industrial*, (16), 45-68.
- Pérez-Cadahía, B., Laffon, B., Pásaro, E., and Méndez, J. (2006). Genetic damage induced by accidental environmental pollutants. *The Scientific World Journal*, 6, 1221-1237.
- Perry, P., and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251(5471), 156.

- Pinto, H. H. (2010). Desastre ecológico y ambiental en Huancavelica. *Investigaciones sociales*, 14(25), 321-338.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., and Mudry, M. D. (2008). *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(2), 202-209.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., and Mudry, M. D. (2008). *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(2), 202-209.
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., y Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera: Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología aplicada*, 5(1-2), 149-155.
- Quispe, E. C., Alfonso, L., Flores, A., Guillén, H., y Ramos, Y. (2009). Bases para un programa de mejora de alpacas en la region altoandina de Huancavelica-Perú. *Archivos de zootecnia*, 58(224), 705-716.
- Ramírez, C. (2018). El desarrollo de proyectos mineros y su impacto en las comunidades de su área de influencia. *Anuario del Conflicto Social*, (8).
- Ramos Gonzalez, M. (2014). "Descripción del patrón de diferenciación longitudinal de los cromosomas de alpacas y llamas". Tesis de maestria. UNMSM. Ciencias Biologicas, Lima, 2014.
- Ramos, G., Descailleaux, L., Velásquez, R., Huanca, L., Iannuzzi, L., and Perucatti, A. (2014). Adaptation of the lymphocyte culture technique of alpacas and llamas for the analysis of sister chromatid exchange (SCE). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*, 25(4), 461-467.
- Raposo, A., Roberto Carvalho, C., and Campos Otoni, W. (2004). Statistical and image analysis of sister chromatid exchange in maize. *Hereditas*, 141(3), 318-322.
- Ray, S. (1996). Evaluating the genotoxicity of quinacrine in mammals using the sister chromatid exchange test.

- Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvosome comprising BLM, topoisomerase III α , and BLAP75. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13861-13864.
- Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., and Piva, F. (2005). Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 63-69.
- Renieri, C., Frank, E. N., Rosati, A. Y., y Antonini, M. (2009b). Definición de razas en llamas y alpacas. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 45, 45-54.
- Renieri, C., Valbonesi, A., La Manna, V., Antonini, M., and Asparrin, M. (2009a). Inheritance of Suri and Huacaya type of fleece in Alpaca. *Italian Journal of Animal Science*, 8(1), 83-91.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M. D., y Jimenez, E. E. G. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo: I2+ D*, 16(2), 66-77.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M. D., y Jimenez, E. E. G. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo: I2+ D*, 16(2), 66-77.
- Rodríguez, A. R. (2003). Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos (No. Q 113. C53 2003 no. 124).
- Saldiva, P. H. N., y Böhm, G. M. (1998). Animal indicators of adverse effects associated with air pollution. *Ecosystem Health*, 4(4), 230-235.
- Sinitsky, M. Y., Minina, V. I., Gafarov, N. I., Asanov, M. A., Larionov, A. V., Ponasenkov, A. V., and Druzhinin, V. G. (2016). Assessment of DNA damage in underground coal miners using the cytokinesis-block micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 31(6), 669-675.
- Šívková, K., and Dianovský, J. (1995). Sister-chromatid exchanges after exposure to metal-containing emissions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 327(1-2), 17-22.
- Somers, C. M. (2011). Ambient air pollution exposure and damage to male gametes: human studies and in situ 'sentinel' animal experiments. *Systems biology in reproductive medicine*, 57(1-2), 63-71.

- Squadrone, S., Abete, M. C., Rizzi, M., Monaco, G., and Favaro, L. (2018). Bioaccumulation of Trace and Non-trace Elements in Blood and Fibers of Alpacas (*Vicugna pacos*) that Graze in Italian Pastures. *Water, Air, and Soil Pollution*, 229(2), 41.
- Stagos, D., Spanou, C., Margariti, M., Stathopoulos, C., Mamuris, Z., Kazantzoglou, G., and Kouretas, D. (2007). Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 5246-5252.
- Sunada, S., Haskins, J. S., and Kato, T. A. (2019). Sister Chromatid Exchange as a Genotoxic Stress Marker. In *Radiation Cytogenetics* (pp. 61-68). Humana, New York, NY.
- Tapisso, J. T., Marques, C. C., da Luz Mathias, M., & da Graça Ramalhinho, M. (2009). Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to cadmium, lead and zinc. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 678(1), 59-64.
- Taylor, J. H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics*, 43(3), 515.
- Taylor, J. H., Woods, P. S., and Hughes, W. L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43(1), 122.
- Taylor, K. M., Hungerford, D. A., Snyder, R. L., and Ulmer Jr, F. A. (1968). Uniformity of karyotypes in the Camelidae. *Cytogenetic and Genome Research*, 7(1), 8-15.
- Torres, F. (2005). Desertificación por minería metálica en páramos y bosques de neblina de nacientes de cuenca en norte de Perú. *Zonas Áridas*, 9(1), 63-82.
- Torres, J. (2001). Estrategia y plan de acción de la biodiversidad para el departamento de Huancavelica como base de su desarrollo sostenible. *Comunidad Andina. Banco Interamericano de Desarrollo*. Lima-Perú, 132.
- Tucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R., and Carrano, A. V. (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 297(2), 101-180.

- Ucur, A., Palanduz, S., Cefle, K., Ozturk, S., Tutkan, G., Vatansever, S., and Tascioglu, C. (2003). Sister chromatid exchange and mitotic index in patients with cirrhosis related to hepatitis B and C viruses and in chronic carriers. *Hepato - gastroenterology*, 50(54), 2137-2140.
- Udroi, I. (2007). Pruebas citogenéticas aplicadas al control de alimentos de origen animal. *Revista Veterinaria*, 18(1), 62-64.
- Verschaeve, L., and Gilles, J. (1995). Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 54(1), 112-119.
- Vilchez J. y Meza E. (2006) Programa de Mejoramiento Genético de Alpacas (*Lama pacos*) y Llamas (*Lama glama*) en la Región de Ayacucho. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA), Estación Experimental Agraria Canaan. Región Ayacucho-Sede Central, 19 - 21.
- Wheeler, J. C. (1995). Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 54(3), 271-295.
- Wheeler, J. C., Stanley, H. F., and Russel, A. J. (1992). A measure of loss: prehispanic llama and alpaca breeds. *Archivos de zootecnia*, 41(154), 17.
- Wilson III, D. M., and Thompson, L. H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1-2), 11-23.
- Wójcik, A., Bruckmann, E., and Obe, G. (2004). Insights into the mechanisms of sister chromatid exchange formation. *Cytogenetic and genome research*, 104(1-4), 304-309.
- Wójcik, E., and Smalec, E. (2012). Sister chromatid exchange in polish white improved goats (*Capra hircus*). *Folia biologica*, 60(3-4), 141-146.
- Wójcik, E., Smalec, E., and Danielewicz, A. (2011). Sister chromatid exchange in selected horse breeds (*Equus caballus*). *Archives Animal Breeding*, 54(2), 107-114.
- Yi, H., and Si, L. (2007). Vicia root-mirconucleus and sister chromatid exchange assays on the genotoxicity of selenium compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 630(1-2), 92-96.

- Yucra Cano, L. E. (2017). "Sistema de comercialización y situación sociocultural, económica y ambiental de la cadena de producción de la fibra de alpaca en el distrito de Macusani, provincia de Carabaya, Puno". Tesis de maestría. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
- Zakharov, A. F., and Egorina, N. A. (1972). Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. *Chromosoma*, 38(4), 341-365.